

# Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von Prenyltransferasen und NRPS-Enzymen aus Ascomyceten

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Carsten Wunsch**  
**aus Teterow**

Marburg/Lahn, 2014

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am 16.12.2014.

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2014

Hochschulkennziffer: 1180

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Publikationen</b>	<b>VI</b>
<b>Präsentationen bei Tagungen</b>	<b>VI</b>
<b>Erklärung</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungen und Fachbegriffe</b>	<b>VIII</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Ascomycota</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Aspergillus</b>	<b>6</b>
1.2.1 Allgemeines	6
1.2.2 <i>Aspergillus (Emericella) nidulans</i>	7
1.2.3 <i>Neosartorya fischeri</i>	9
1.2.4 <i>Aspergillus terreus</i>	10
<b>1.3 Indolalkaloide</b>	<b>12</b>
1.3.1 Allgemeines	12
1.3.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen	12
1.3.3 <i>N1</i> -prenylierte Indolalkaloide	14
1.3.4 <i>C3</i> -prenylierte Indolalkaloide	15
1.3.5 <i>C7</i> -prenylierte Indolalkaloide	16
<b>1.4 Prenyltransferasen</b>	<b>18</b>
1.4.1 Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen	18
1.4.2 Proteinprenyltransferasen	19
1.4.3 Aromatische Prenyltransferasen	19
1.4.3.1 Prenyltransferasen der UbiA-Superfamilie	20
1.4.3.2 Prenyltransferasen der PT-barrel-Superfamilie	21
1.4.3.2.1 Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe	21
1.4.3.2.2 Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie	22
1.4.3.3 Prenyltransferasen der LtxC-Gruppe	26
<b>1.5 Nichtribosomale Peptidsynthetasen</b>	<b>26</b>
<b>1.6 NRPS-ähnliche Enzyme</b>	<b>31</b>
<b>2 Zielsetzung für die vorliegende Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme</b>	<b>34</b>
3.1.1 Chemikalien	34
3.1.2 Materialien zur Chromatographie	35
3.1.3 Enzyme und Kits	35



<b>3.2 Plasmide, Primer, Mikroorganismen</b>	<b>36</b>
3.2.1 Plasmide	36
3.2.2 Primer	39
3.2.3 Mikroorganismen	41
3.2.3.1 Bakterienstämme	41
3.2.3.2 Pilzstämme	41
<b>3.3 Nährmedien und Puffer</b>	<b>42</b>
3.3.1 Nährmedien	42
3.3.1.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	42
3.3.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von Ascomyceten	43
3.3.2 Antibiotika und Zusätze	45
3.3.2.1 Antibiotika	45
3.3.2.2 Supplementierung bei Verwendung von Auxotrophiemarkern	45
3.3.3 Puffer und Lösungen	45
3.3.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	46
3.3.3.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von <i>E. coli</i>	47
3.3.3.3 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese	47
3.3.3.4 Puffer zur Proteinaufreinigung	47
3.3.3.5 Puffer und Lösungen zur Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	48
3.3.3.6 Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung	49
3.3.3.7 Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von <i>A. nidulans</i> TN02A7	49
<b>3.4 Bioinformatische Analysen</b>	<b>51</b>
<b>3.5 Methoden der Mikrobiologie</b>	<b>51</b>
3.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	51
3.5.2 Kultivierung von Ascomyceten	52
3.5.2.1 Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	52
3.5.2.2 Kultivierung von <i>A. niger</i>	52
3.5.2.3 Kultivierung von <i>A. terreus</i>	52
3.5.2.4 Kultivierung von <i>N. fischeri</i>	52
3.5.3 Herstellung einer Sporensuspension von Ascomyceten	52
<b>3.6 Methoden der Molekularbiologie</b>	<b>53</b>
3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten	53
3.6.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion	53
3.6.1.2 DNA-Isolierung aus <i>A. nidulans</i> TN02A7, <i>A. niger</i> AB 1.13 und deren Transformanten	54
3.6.2 Isolierung von RNA aus <i>A. terreus</i> und Herstellung von cDNA	54
3.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse)	55
3.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	56
3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese	58
3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	58
3.6.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	58
3.6.8 Restriktionsverdau	59
3.6.9 Ligation von DNA-Fragmenten	60
3.6.10 CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	60
3.6.10.1 Herstellung chemokompetenter Zellen	60
3.6.10.2 Herstellung ultrakompetenter Zellen	61

3.6.10.3 Hitzeschock-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	61
3.6.11 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	62
3.6.11.1 Herstellung elektrokompeter Zellen	62
3.6.11.2 Elektroporation	62
3.6.12 Blau-Weiß-Selektion	62
3.6.13 Transformation von <i>A. nidulans</i> TN02A7 durch Protoplastierung	63
<b>3.7 Methoden der Biochemie</b>	<b>64</b>
3.7.1 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss	64
3.7.2 Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose	65
3.7.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	65
3.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	66
3.7.5 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels NanoDrop	66
3.7.6 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	67
3.7.7 Enzymatische Reaktionsansätze	67
3.7.7.1 CdpC7PT-Aktivitätsassays	67
3.7.7.2 EAU34068-His <sub>6</sub> -Aktivitätsassays	68
3.7.7.3 Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte von CdpC7PT	69
3.7.7.4 Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte mit EAU34068-His <sub>6</sub>	69
<b>3.8 Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten</b>	<b>69</b>
3.8.1 Extraktion der Kulturüberstände von <i>A. nidulans</i> TN02A7 und Transformanten	69
3.8.2 Extraktion des Mycel von <i>A. nidulans</i> TN02A7 und Transformanten	70
<b>3.9 Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen</b>	<b>70</b>
3.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	70
3.9.1.1 Geräte und Säulen	70
3.9.1.2 Analytik der verschiedenen Reaktionsansätze	71
3.9.1.3 Isolierung der enzymatischen Produkte der verschiedenen Reaktionen	71
3.9.1.4 Analytik der Extrakte von <i>A. nidulans</i> TN02A7 und Transformanten	71
3.9.1.5 Isolierung aus den Transformanten von <i>A. nidulans</i> TN02A7	71
3.9.2 Massenspektrometrie (MS)	72
3.9.2.1 Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (LC/MS)	72
3.9.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	72
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus Ascomyceten</b>	<b>73</b>
4.1.1 Einleitung	73
4.1.2 Charakterisierung der Prenyltransferase CdpC7PT	74
4.1.2.1 Sequenzanalysen von <i>cdpC7PT</i> /CdpC7PT	74
4.1.2.2 Amplifikation von <i>cdpC7PT</i> aus genomischer DNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958	75
4.1.2.3 Klonierung und Transformation	76
4.1.2.4 Überproduktion von CdpC7PT-His <sub>6</sub> und Enzymaktivitätstests	78
4.1.2.5 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte von CdpC7PT	82
4.1.2.6 Vergleich der Substratspezifität von CdpC7PT und CTrpPT	88
4.1.2.7 Biochemische Eigenschaften von CdpC7PT und Bestimmung der kinetischen Parameter	88
4.1.2.8 Ionenabhängigkeit der CdpC7PT-Reaktion	91
4.1.2.9 Kultivierung von <i>A. terreus</i> und Identifizierung von C7-prenylierten zyklischen Dipeptiden	92
4.1.3 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU34068 aus <i>A. terreus</i> DSM 1958	95

4.1.3.1 Einleitung	95
4.1.3.2 Amplifikation von <i>ATEG_04999</i> aus genomischer DNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958	96
4.1.3.3 Klonierung und Transformation	97
4.1.3.4 Überproduktion und Aufreinigung von EAU34068-His <sub>6</sub>	98
4.1.3.5 Aktivitätstest mit EAU34068-His <sub>6</sub>	99
4.1.3.6 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte mit EAU34068-His <sub>6</sub>	102
4.1.3.7 Biochemische Eigenschaften von EAU34068-His <sub>6</sub> und Bestimmung der kinetischen Parameter	104
4.1.4 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU36097 aus <i>A. terreus</i> DSM 1958	106
4.1.4.1 Einleitung	106
4.1.4.2 Amplifikation von <i>ATEG_02823</i> aus genomischer DNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958	107
4.1.4.3 Klonierung und Transformation	108
4.1.4.4 Überproduktion und Aufreinigung von EAU36097-His <sub>6</sub>	109
4.1.5 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU33872 aus <i>A. terreus</i> DSM 1958	110
4.1.5.1 Einleitung	110
4.1.5.2 Amplifikation von <i>ATEG_06111</i> aus genomischer DNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958	111
4.1.5.3 Klonierung und Transformation	112
4.1.5.4 Überproduktion und Aufreinigung von EAU33872-His <sub>6</sub>	114
4.1.6 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU38487 aus <i>A. terreus</i> DSM 1958	115
4.1.6.1 Einleitung	115
4.1.6.2 Amplifikation von <i>ATEG_01730</i> aus genomischer DNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958	116
4.1.6.3 Klonierung und Transformation	117
<b>4.2 Untersuchungen zu Nichtribosomalen Peptidsynthetasen und NRPS- ähnlichen Enzymen aus Ascomyceten</b>	<b>119</b>
4.2.1 Einleitung	119
4.2.2 Charakterisierung der putativen NRPS EAA61517 aus <i>A. nidulans</i>	120
4.2.2.1 Amplifikation des NRPS-Gens <i>AN9226</i> inklusive des-Promotor- und Terminatorbereiches	121
4.2.2.2 Klonierung und Transformation	122
4.2.2.3 Kultivierung und Analyse von <i>A. nidulans</i> TN02A7 Transformanten	125
4.2.2.4 Kultivierung und Analyse von <i>A. niger</i> AB 1.13 Transformanten	133
4.2.2.5 Deletion von Promotor <i>AN9226p</i> im Konstrukt pCaW15	135
4.2.3 Charakterisierung der putativen NRPS EAW25548 aus <i>N. fischeri</i>	139
4.2.3.1 Amplifikation des NRPS-Gens <i>NFIA_043670</i> inklusive des-Promotor- und Terminatorbereiches	140
4.2.3.2 Klonierung und Transformation	141
4.2.4 Charakterisierung des putativen NRPS-ähnlichen Enzyms EAU36364 aus <i>A. terreus</i>	144
4.2.4.1 Amplifikation von <i>ATEG_03090</i> inklusive des-Promotor- und Terminatorbereiches	145
4.2.4.2 Klonierung und Transformation	145
4.2.5 Zielgerichtete Produktion von Sekundärmetaboliten durch die Kombination der NRPS FtmPS und Prenyltransferasen in <i>Aspergillus</i>	148
4.2.5.1 Amplifikation des NRPS-Gens <i>ftmPS</i> mit transkriptionsfördernden Elementen	150
4.2.5.2 Klonierung und Transformation	151
4.2.5.3 Modifikation von pHL5 mit transkriptionsfördernden Elementen für die Verwendung in <i>Aspergillus</i>	158
4.2.5.4 Transformation von pCaW34stop in <i>A. nidulans</i> CaW03 ( <i>ftmPS</i> )	164
<b>5 Diskussion</b>	<b>168</b>
<b>5.1 Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus Ascomyceten</b>	<b>168</b>
5.1.1 Die Prenyltransferase CdpC7PT	168
5.1.2 Die Prenyltransferase EAU34068	171
5.1.3 Die putativen Prenyltransferasen EAU36097, EAU33872 und EAU38487	173

<b>5.2 Untersuchungen zu putativen Nichtribosomalen Peptidsynthetasen und NRPS-ähnlichen Enzymen aus Ascomyceten</b>	<b>174</b>
5.2.1 Untersuchungen zu den Nichtribosomalen Peptidsynthetasen EAA61517 und EAW25548, sowie dem NRPS-ähnlichen Enzym EAU36364	174
5.2.2 Zielgerichtete Produktion von Sekundärmetaboliten durch die Kombination der NRPS FtmPS und Prenyltransferasen in <i>Aspergillus</i>	178
<b>6 Referenzen</b>	<b>181</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>200</b>
7.1 Multi-Proteinsequenzvergleiche ausgewählter Prenyltransferasen zur Unterstützung der Intron-Exon Vorhersage	200
7.1.1 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit CdpC7PT und EAU38487	200
7.2 NMR-, MS-, H-H-COSY-, HSQC und HMBC-Spektren der isolierten Substanzen aus den CdpC7PT-Reaktionen	202
7.3 LC/MS-Chromatogramme des Pilzes <i>A. terreus</i> DSM 1958	219
7.4 NMR- Spektren der isolierten Substanzen aus den EAU34068-Reaktionen	221
7.5 NMR- und MS- Spektren der isolierten Substanz Sterigmatocystin aus den Transformanten <i>A. nidulans</i> CaW11 (AN9226) und CaW32 (NFIA_043670)	224
7.6 NMR- , MS- Spektren der isolierten Substanz Brevianamid F aus den Transformanten <i>A. nidulans</i> CaW03 (ftmPS)	226
7.7 NMR- und MS- Spektren der isolierten Substanz <i>cyclo</i> -L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro aus dem Transformanten <i>A. nidulans</i> KM36 (cdpNPT)	227
<b>Danksagung</b>	<b>228</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>229</b>

## Publikationen

**Carsten Wunsch\***, Kathrin Mundt\* and Shu-Ming Li (2014), Targeted production of secondary metabolites by coexpression of non-ribosomal peptide synthetase and prenyltransferase genes in *Aspergillus*, Appl. Microbiol. Biotechnol., submitted.

**Carsten Wunsch**, Hui-Xi Zou, Uwe Linne and Shu-Ming Li (2014), C7-prenylation of tryptophanyl and O-prenylation of tyrosyl residues in dipeptides by an *Aspergillus terreus* prenyltransferase, Appl. Microbiol. Biotechnol., DOI: 10.1007/s00253-014-5999-6.

## Präsentationen bei Tagungen

Kathrin Mundt, **Carsten Wunsch** and Shu-Ming Li

Targeted coexpression of a NRPS gene with different prenyltransferase genes in *Aspergillus nidulans*

Vortrag auf Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPHG), 10.-12. März 2014, Wuppertal

Kathrin Mundt, **Carsten Wunsch**, Julia Winkelblech, Shu-Ming Li

Nichtribosomale Peptidsynthetasen und Prenyltransferasen als Instrument zur Herstellung neuer Wirkstoffe

Posterpräsentation, Evaluation des LOEWE-Programmes, 15. August 2012, Marburg (MPI)

**Carsten Wunsch**, Kathrin Mundt, Xia Yu und Shu-Ming Li

Nichtribosomale Peptidsynthetasen und Prenyltransferasen als Instrument zur Herstellung neuer Wirkstoffe

Posterpräsentation, Synthetische Mikrobiologie - Perspektiven für Biotechnologie und Pharmazie (SynMikro-Fachtagung), 04. Mai 2011, Marburg (Alte Aula)

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von Prenyltransferasen und NRPS-Enzymen aus Ascomyceten“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Carsten Wunsch)

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Für Maßeinheiten wurde das Internationale Einheitensystem (SI; *Système international d'unités*) und die davon abgeleiteten Einheiten verwendet. Aminosäuren wurden mit dem Ein-Buchstaben-Code der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ abgekürzt. Akronyme und Abkürzungen sind im Text an entsprechender Stelle erläutert, wenn sie für das weitere Verständnis notwendig sind.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc. No.	Accession number (Kennnummer)
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
AMM	Aspergillus Minimal Medium
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCRP	breast cancer resistance protein
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
br	breit
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bZIP	basic leucine zipper Domäne (Transkriptionsfaktor)
c	Konzentration
C	Cytosin
Cam <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Carb	Carbenicillin
CDH	Czapec Dox Hefeextrakt
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
d	Duplett
Da	Dalton
dd	Duplett vom Duplett
ddd	Duplett vom Duplett vom Duplett
ddt	Duplett vom Duplett vom Triplet
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Deoxyribonuclease I (Desoxyribonuklease I)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dt	Duplett vom Triplet

DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast protein liquid chromatography
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GMM	Glucose Minimal Medium
<i>gpdA</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase
HA	Hefe-Malzextrakt-Agar
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
His <sub>8</sub>	Oktahistidin
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
IPPS	Isoprenyl-Diphosphat-Synthase
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
l	Liter
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
LaeA	loss of <i>afIR</i> expression- <u>A</u> (Verlust der <i>afIR</i> Expression)
LB	Lysogeny broth
M	molar
m	Multipllett
Mb	Megabasen
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MFS	Major Facilitator Superfamilie
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup> / NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
<i>N. fischeri</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
OD	Optische Dichte
p	Promotor
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>P. fellutanum</i>	<i>Penicillium fellutanum</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)



PDS	Potatoe-Dextrose Sucrose Medium
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
Primer	Oligonukleotid für die PCR
<i>pyrG</i>	Orotidin-5' -Phosphat Decarboxylase Gen
<i>pyroA4</i>	Auxotrophie-mutation in <i>A. nidulans</i> , Pyridoxin-Biosynthesegen
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase A	Ribonuclease A (Ribonuklease A)
RP	reverse phase
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
StuA	Transkriptionsfaktor ( <i>Aspergillus nidulans stunted gene</i> )
t	Triplett
T	Thymin
T <sub>a</sub>	Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
td	Triplett vom Duplett
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
<i>trpC<sub>term</sub></i>	Terminator des <i>trpC</i> -Genes aus <i>Aspergillus nidulans</i>
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat
U	Unit
UV	ultraviolett
ün	über Nacht
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
V	Volt
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
× g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
YG	Yeast Glucose (Hefeextrakt-Glucose Medium)
YME	Yeast Malt Extract (Hefeextrakt-Malzextrakt Medium)

## Zusammenfassung

Die Produktion sekundärer Stoffwechselprodukte durch Mikroorganismen stellt ein beachtliches Reservoir an biologisch-aktiven Naturstoffen da, die auch pharmazeutische Bedeutung haben können. Darunter fallen Antibiotika, Zytostatika oder auch Immunsuppressiva. Diese sind im Gegensatz zu Metaboliten des Primärstoffwechsels zunächst für Wachstum und Entwicklung entbehrlich, jedoch auf den zweiten Blick essentiell für die Bewältigung zahlreicher Wechselwirkungen des Individuums mit seiner Umwelt. Auch die filamentösen Pilze tragen ihren Teil zur Diversität der Naturstoffe bei. Die Grundstrukturen solcher Substanzen beruhen häufig auf der Mitwirkung von Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), NRPS-ähnlichen Enzymen, Polyketidsynthasen (PKS) und Hybridenzymen aus NRPS/PKS. Durch den Einfluss weiterer Modifikationsenzyme (*tailoring enzymes*), wie Prenyltransferasen, wird die biologische Vielfalt und Aktivität deutlich gesteigert. Zur gezielten chemoenzymatischen Synthese neuer Naturstoffe sind daher fundierte Kenntnisse über die Reaktionsmechanismen, sowie der biochemischen Eigenschaften dieser Enzymklassen von zentraler Bedeutung. Mit dieser Arbeit sollten fünf putative Prenyltransferasen aus *A. terreus* charakterisiert werden. Für zwei Vertreter CdpC7PT und EAU34068 konnte dieses Vorhaben bisher erfolgreich absolviert werden. CdpC7PT ist hierbei zum einen für die C7-Prenylierung von tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden verantwortlich und stellt zum anderen die erste beschriebene Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie dar, welche eine O-Prenylierung in Anwesenheit von tyrosinhaltigen zyklischen Dipeptide vollführt. Bei der Suche nach geeigneten Substraten für EAU34068 konnten trotz der Sequenzidentitäten von bis zu 42 % auf Aminosäureebene zu zyklischen Dipeptid-akzeptierenden Prenyltransferasen, diese Substratgruppe leider nicht bestätigt werden. Erst eine ausgedehnte Suche zeigte die Flavanone Eriodictyol und Naringenin, die Hydroxynaphthaline 1-Naphtol und 1,7-Dihydroxynaphthalin, sowie das Xanthon 1,3,6-Trihydroxyxanthon als Substrate für eine Geranylierung auf. Dabei wurden regioselektive Prenylierungen bei allen diesen Substanzen beobachtet. Zwei weitere putative Prenyltransferasegene *ATEG\_02823* und *ATEG\_01730* befinden sich derzeit im Klonierungsstadium und eine weitere bedarf weiterer Expressionsoptimierungen *ATEG\_06111* zum Erhalt des gewünschten rekombinanten Proteins (EAU33872).

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der NRPS EAA61517 und EAW25548, sowie des NRPS-ähnlichen Enzyms EAU36364. Die zugehörigen Gene *AN9226*, *NFIA\_043670* und *ATEG\_03090* stammen entsprechend der Reihenfolge aus *A. nidulans*, *N. fischeri* und *A. terreus* und sollten in ein geeignetes Konstrukt zur Expression in *A. nidulans* TN02A7 überführt werden. Für *AN9226*, sowie *NFIA\_043670* konnten positive Transformanten erhalten werden. Durch den Vergleich mit dem untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 wurde anschließend die Sekundärmetabolitproduktion analysiert. Insbesondere für *AN9226* wurden zahlreiche Strategien zur Optimierung der Expression und damit verbundener Produktzunahme verfolgt, wie beispielsweise die Mitwirkung des konstitutiven *gpdA* Promotors. Zum jetzigen Zeitpunkt konnte jedoch kein Produkt in direkten Zusammenhang mit dem jeweiligen inserierten Gen gebracht werden, aber in jedem Fall wurde die unerwartete Akkumulation des Polyketides Sterigmatocystin beobachtet.

Durch die Kombination der NRPS FtmPS aus *N. fischeri*, dessen Ortholog aus *A. fumigatus* *cyclo*-L-Trp-L-Pro synthetisiert, mit verschiedenen Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie in *A. nidulans* sollten zum einen die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden und zum anderen auf diesem Wege ein System zur gezielten *in vivo* Synthese gewünschter prenylierter Derivate etabliert werden. Das NRPS-Gen *NFIA\_093690* wurde zu diesem Zweck unter die Kontrolle des konstitutiven *gpdA* Promotors, sowie des *trpC* Terminators gestellt und in den zur Transformation geeigneten Vektor pJW24 integriert. Nach erfolgreicher Transformation von *A. nidulans* TN02A7 konnte durch Analyse der Sekundärmetabolitproduktion das erstrebte *cyclo*-L-Trp-L-Pro bestätigt werden. Anschließend erfolgte die Koexpression der beiden reversen C2-Prenyltransferasen CdpC2PT und BrePT aus *N. fischeri* und *A. versicolor*, sowie der reversen C3-Prenyltransferasen CdpC3PT und CdpNPT aus *N. fischeri* und *A. fumigatus*. Die kodierenden Gene wurden ebenfalls mit den bereits erwähnten regulatorischen Elementen und dem Selektionsmarker *pyroA* in einem Vektor zusammengefügt und in den *ftmPS*-Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) eingebracht. Durch weiterführende Arbeiten von Frau Dr. Kathrin Mundt konnten vergleichend zu *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) zusätzliche Produkte im Sekundärmetabolitspektrum identifiziert werden. Die Strukturaufklärung erbrachte im Fall von CdpC2PT und BrePT die Bestätigung einer reversen C2-Prenylierung von *cyclo*-L-Trp-L-Pro, für CdpNPT ein *syn-cis* konfiguriertes reverses C3-prenyliertes Derivat und bei CdpC3PT sowohl reverse C3- und C2-prenylierte Derivate, als auch eine reguläre Prenylierung an Position N1.

## Summary

The production of secondary metabolites by microorganisms represents a considerable reservoir of biologically active natural products, which can exhibit pharmaceutical importance like antibiotics, antitumor drugs or immunosuppressives. These are in contrast to metabolites of primary metabolism initially dispensable for growth and development, but at second glance essential for the management of numerous interactions of the individual with its environment. The filamentous fungi contribute to the diversity of natural products. The backbone structures of these substances are often based on the participation of nonribosomal peptide synthetases (NRPS), NRPS-like enzymes, Polyketide synthases (PKS), and hybrid enzymes of NRPS/PKS. Due to the influence of other tailoring enzymes like prenyltransferases the biodiversity and biological activity is significantly increased. For selective chemoenzymatic synthesis of new natural products a well-founded understanding of the reaction mechanisms, as well as the biochemical properties of these classes of enzymes are of crucial significance. With this work, five putative prenyltransferases from *A. terreus* should be characterized. For two representatives, CdpC7PT and EAU34068 this intension was successfully realized. CdpC7PT is responsible for the C7-prenylation of tryptophan-containing cyclic dipeptides and additionally functions as the first reported prenyltransferase of the DMATS superfamily which performs an *O*-prenylation in the presence of tyrosine-containing cyclic dipeptides. In the case of EAU34068 sequence identities of up to 42 % at the amino acid level were found between this enzyme and other characterized cyclic dipeptide prenyltransferases. This prompted us to test such compounds but without success. After extensive testing of different substrate classes, the flavanones eriodictyol and naringenin, the hydroxynaphthalenes 1-naphthol and 1,7-dihydroxynaphthalene, and the xanthone 1,3,6-trihydroxyxanthone could be confirmed as aromatic substrates for geranylation. EAU34068 exhibited a high regioselectivity of the prenylation for all of these substrates. Two additional putative prenyltransferase genes *ATEG\_02823* and *ATEG\_01730* are currently at the cloning vectors pCaW5 and pCaW17, respectively, and another putative prenyltransferase gene *ATEG\_06111* is already subcloned in the expression vector pCaW9 to obtain the desired recombinant protein (EAU33872). Another focus of this work was the characterization of the nonribosomal peptide synthetases EAA61517 and EAW25548, as well as the NRPS-like enzyme EAU36364. The corresponding genes *AN9226*, *NFIA\_043670* and *ATEG\_03090* from *A. nidulans*, *N. fischeri* and *A. terreus*,

respectively, should be cloned in a suitable construct for expression in *A. nidulans* TN02A7. At least for AN9226 and for NFIA\_043670, positive transformants were obtained. Screening for additional secondary metabolites were performed by comparing the transformants with the untransformed strain *A. nidulans* TN02A7. In particular, for AN9226 numerous strategies were carried out to gain an increased product formation, e.g. expression mediated by the constitutive *gpdA* promoter. However, until now no product formation could be identified, with one exception of the unexpected accumulation of the polyketide Sterigmatocystin.

By combination of the NRPS FtmPS from *N. fischeri*, whose ortholog from *A. fumigatus* is known to produce *cyclo*-L-Trp-L-Pro, with different prenyltransferases of the DMATS superfamily in *A. nidulans*, the results of *in vitro* assays with recombinant proteins should be confirmed *in vivo*. Additionally, a suitable technique to produce desired prenylated derivatives by *in vivo* synthesis should be established. For this purpose the nonribosomal peptide synthetase gene NFIA\_093690 was placed under the control of the constitutive *gpdA* promoter, *trpC* terminator and afterwards integrated in the appropriate vector pJW24 for transformation of *A. nidulans* TN02A7. After successful transformation of *A. nidulans* TN02A7 with this vector, an additional and distinctive product could be identified by analyzing secondary metabolite production in comparison to the untransformed strain. This product could be confirmed by structure elucidation as the favoured *cyclo*-L-Trp-L-Pro. By coexpression of the prenyltransferase genes in one of the transformants which already comprises the *ftmPS* gene prenylated derivatives should be produced. As representatives two C2 reverse prenyltransferases CdpC2PT and BrePT from *N. fischeri* and *A. versicolor*, as well as the reverse C3-prenyltransferases CdpC3PT and CdpNPT from *N. fischeri* and *A. fumigatus* were selected. The encoding genes have also been combined with the aforementioned regulatory elements and the *pyroA* selection marker for the transformation of the selected transformant *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*). By further work of Dr. Kathrin Mundt concerning the identification of additional products in comparison to the untransformed strain additional products were observed. After structure elucidation the products of CdpC2PT and BrePT were confirmed as reversely C2-prenylated *cyclo*-L-Trp-L-Pro. In the case of CdpNPT a *syn-cis*-configured reversely C3-prenylated derivative and for CdpC3PT both reversely C3- and C2-prenylated derivatives, as well as a regular prenylation at position N1 were obtained.

# 1 Einleitung

## 1.1 Ascomycota

Die Schlauchpilze (Ascomycota) stellen mit etwa 60000 bis 75000 bekannten Arten (Kirk *et al.*, 2008; Webster & Weber 2007) die weitaus größte Abteilung im gesamten Pilzreich dar. Dennoch wird in Ermangelung eines konkreten Wertes von bis zu 300000 Arten und Varianten ausgegangen (Hawksworth 2001). Gegliedert werden die Ascomycota in drei Unterabteilungen, die Taphrinomycotina, Saccharomycotina und die Pezizomycotina. Zur letzteren gehören sowohl die Familien Arthrodermataceae und Clavicipitaceae, als auch die Familie der Trichocomaceae mit den Gattungen *Aspergillus* und *Neosartorya*, die auch Gegenstand dieser Arbeit waren und auf die im späteren Verlauf gesondert eingegangen wird. Aufgrund dieser außerordentlichen Vielfalt und ihrem Potential zur Biosynthese von Naturstoffen mit pharmazeutischer und biotechnologischer Bedeutung stellt diese Abteilung auch eine der ökonomisch bedeutensten innerhalb der Pilze dar. So werden Ascomyceten in der Lebensmittelindustrie zur Produktion von organischen Säuren, wie Äpfelsäure (*Paecilomyces varioti*) oder auch Ascorbinsäure (*Penicillium* spp.) und zur Fermentation von Nahrungs- und Genussmitteln (*Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt. Andere Anwendungsfelder sind die Produktion von Enzymen oder rekombinanten Enzymen, wie  $\beta$ -Glucosidasen (*Penicillium* spp.) und Cellulasen (*Trichoderma reesei*), die ihrerseits in der Industrie Verwendung finden (Kück *et al.*, 2009). Pharmazeutische Relevanz zeigen sie beispielsweise durch die Produktion von Steroiden, Antibiotika, wie  $\beta$ -Lactame aus *Penicillium chrysogenum* und auch Immunsuppressiva, vertreten durch Cyclosporin A aus *Tolypocladium inflatum* (Svarstad *et al.*, 2000) und Mycophenolsäure aus verschiedenen *Penicillium*-Stämmen (Hof & Dörries 2014). Ascomyceten sind vorwiegend als Saprobionten und Parasiten von Pflanzen, Tieren und Menschen vorzufinden (Webster & Weber 2007), kommen aber seltener auch als Mykorrhiza (Trüffel) oder in symbiotischer Vergesellschaftungen mit Flechten vor (Ottow 2011). Es finden sich sogar Nematoden-fangende Vertreter, wie *Arthrobotrys oligospora*, die sich somit über die Bildung klebriger Strukturen neue Stickstoffquellen erschließen (Ottow 2011). Morphologisches Charakteristikum ist das schlauchförmige Fortpflanzungsorgan, der sogenannte Ascus (Kück *et al.*, 2009). Dieser dient der sexuellen Vermehrung über die zumeist eingeschlossenen Ascosporen (Hauptfruchtform).

Die ebenfalls weitverbreite asexuelle Reproduktion erfolgt über die häufig pigmentierten Konidiosporen aus den Konidienträgern (Nebenfruchtform). Bisher konnte bei einigen Arten jedoch nur dieses anamorphe oder auch imperfekte Stadium beobachtet werden. Aus diesem Grund werden diese Vertreter unter dem Begriff „fungi imperfecti“ zusammengefasst (Adrio 2003; Campbell & Reece 2003). Beide Fruchtformen beruhen auf einem Geflecht von langgestreckten Zellfäden, den sogenannten Hyphen, welche zu einem Mycel auswachsen und abschließend die Konidienträger oder die Asci bilden.

## 1.2 *Aspergillus*

### 1.2.1 Allgemeines

Die Gattung *Aspergillus* umfasst derzeit ca. 260 Arten (Dermoumi 2009) und wird umgangssprachlich, aufgrund der Form ihrer Konidienträger (Konidiophor), auch als Gießkannenschimmel bezeichnet und beruht dabei auf deren charakteristischen Beschaffenheit. Aufbauend auf einer basalen Zelle, entsteht ein typischerweise unverzweigtes, nicht septiertes und senkrechtstehendes Konidiophor, welches terminal eine vesikelartige Struktur aufweist, die ihrerseits durch Abschnürung direkt Sterigmata bildet (uniseriat) oder durch synchrone Bildung eine Metulae mit aufgelagerten Sterigmata (biseriat) gekennzeichnet ist (Dermoumi 2009; Kück *et al.*, 2009). Diese wiederum schnüren dann die Konidien kettenartig ab. Ist neben dieser Nebenfruchtform auch bereits die Hauptfruchtform der sexuellen Vermehrung bereits bekannt, verlangt die Nomenklatur die Verwendung neuer Gattungsnamen. Demzufolge wird die Hauptfruchtform von *Aspergillus nidulans* als *Emericella nidulans* bezeichnet und im Fall von *Aspergillus fischerianus* als *Neosartorya fischeri*.

Verschiedene *Aspergillus*-Arten beeinflussen hierbei die menschliche Lebensart auf die ein oder andere Art und Weise. *Aspergillus*-Arten können unter anderem durch Lebensmittelbelastung eine schädigende Wirkung über Mykotoxine entfalten. Beispielsweise können durch Kontaminationen von Getreiden oder Nüssen durch *Aspergillus ochraceus* oder *Aspergillus flavus* Mykotoxikosen durch Ochratoxine und Aflatoxine hervorgerufen werden. Ochratoxine zeigen eine hepato- und nephrotoxische Wirkung und Aflatoxine sogar zusätzlich eine karzinogene und immunotoxische Wirkung (Dermoumi 2009; Kück *et al.*, 2009). Ein anderes Mitglied dieser Gattung *Aspergillus fumigatus* ist sowohl in der Lage das zytotoxische Gliotoxin zu produzieren, als auch als Auslöser der oftmals lebensbedrohenden Aspergillose zu fungieren (Sallam *et al.*, 2003; Speth *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite steht hier der

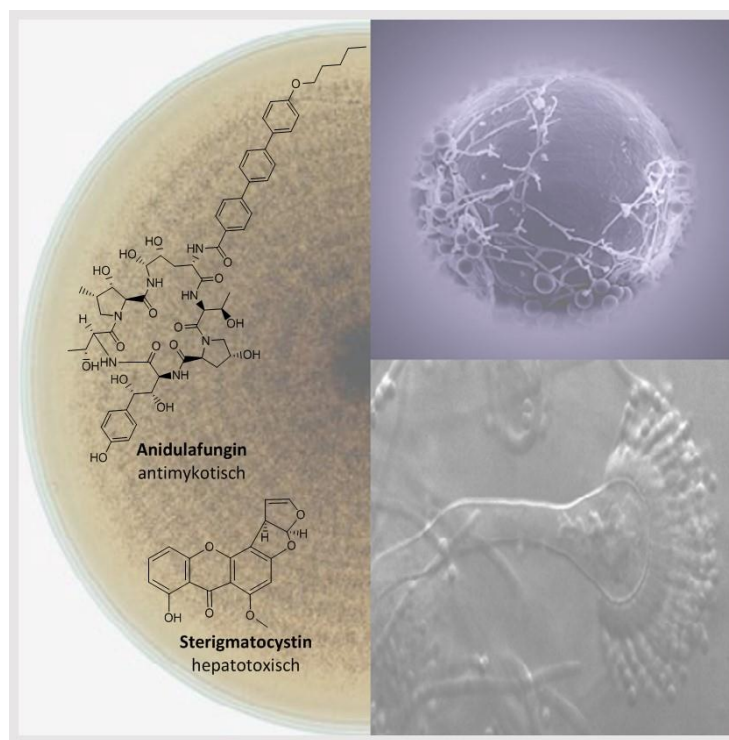
Nutzen zahlreicher *Aspergillus*-Spezies für unterschiedlichste Industriezweige. Im asiatischen Raum werden seit Jahrhunderten *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus soja* zur Fermentation von Lebensmitteln, wie Sake oder Soja-Sauce verwendet. In der Kunststoff- und Textilindustrie wird Itaconsäure zur Produktion von Harzen, Farben und Tensiden benötigt. Diese wird durch *Aspergillus itaconicus* und *Aspergillus terreus* bereitgestellt (Sahm *et al.*, 2013). Außerdem wird im Fall der Zitronensäure beinahe der gesamte Bedarf über die Fermentation von Zweifachzuckern durch *Aspergillus niger* gedeckt. Diese wird unter anderem als Konservierungs- und Säuerungsmittel in der Lebensmittel und Pharmaindustrie verwendet (Sahm *et al.*, 2013; Soccol *et al.*, 2006). Letztere verwendet auch Stämme von *Aspergillus terreus* zur Produktion des Cholesterin-senkenden Statins Lovastatin und des Immunsuppressivums Cyclosporin A (Hajjaj *et al.*, 2001; Sallam *et al.*, 2003). Aber auch andere Statine, wie Simvastatin und Pravastatin werden heute semisynthetisch auf der Grundlage von Lovastatin hergestellt. *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans* und *Neosartorya fischeri* sind Vertreter dieser Gattung und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### **1.2.2 *Aspergillus (Emericella) nidulans***

*Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) ist neben *Neurospora crassa* der Modelorganismus für die Erforschung der eukaryotischen Genregulation (Wortman *et al.*, 2009) und Zellbiologie. *Ascomycota* bringen ein paar entscheidende Vorteile für ihren Einsatz im Labor mit sich. Zum einen lassen sie sich auf unterschiedlichen Medien (Pontecorvo *et al.*, 1953) durch ihre vergleichsweise kurze Generationszeit von drei Stunden (Deckwer *et al.*, 1999) effizient kultivieren und zum anderen befinden sie sich überwiegend im haploiden Lebenszyklus, was gentechnische Veränderungen begünstigt, da sie durch das Fehlen einer zweiten Kopie des Genes nicht kompensiert werden können. Somit kommt es direkt zu einer phänotypischen Ausprägung. Zugleich können aber auch die klassischen Kreuzungsvorgänge anhand der teleomorphen Form untersucht werden (Kück *et al.*, 2009). Insbesondere die Grundlagen der gentechnischen Veränderbarkeit wurden anhand von *A. nidulans* untersucht und dann zum Beispiel auf andere Vertreter der *Ascomycota* übertragen. Durch das zahlreiche Vorhandensein von Mutanten (Nayak *et al.*, 2006), insbesondere auch auxotrophen Stämmen konnten auch geeignete Expressionssysteme entwickelt werden, die zugleich auch die Selektion von Transformanten ermöglichen. Auf diesem Weg können auch Gene des



Sekundärmetabolismus, wie Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) charakterisiert werden (Chiang *et al.*, 2013; Kück & Hoff 2010). *A. nidulans* spielt als Humanpathogen eher eine untergeordnete Rolle, tritt aber in seltenen Fällen auch als Auslöser der Aspergillose, sowie der chronischen granulomatösen Entzündung (Hof & Dörries 2014; Segal *et al.*, 1998) auf. Dennoch verfügt *A. nidulans* auch über das Potential zur Herstellung unterschiedlicher Mykotoxine (Abb. 1-1), wie Aspertoxin, und Sterigmatocystin mit hepatotoxischen und kanzerogenen Eigenschaften (Kück *et al.*, 2009). Sterigmatocystin ist zwar ein Vorläufer in der Biosynthese der Aflatoxine, aber dennoch nicht so potent wie die Aflatoxine. Es bildet in *A. nidulans* zudem das Endprodukt des entsprechenden Biosyntheseweges (Bennett & Klich 2003; Brown *et al.*, 1996). Weiterhin verfügt er unter anderem aber auch über die Möglichkeit zur Biosynthese des Echinocandin und Anidulafungin, welches breite antimykotische Wirkung gegenüber den Hefepilzen der Gattung *Candida* spp. aufzeigt (Kofla & Ruhnke 2011).



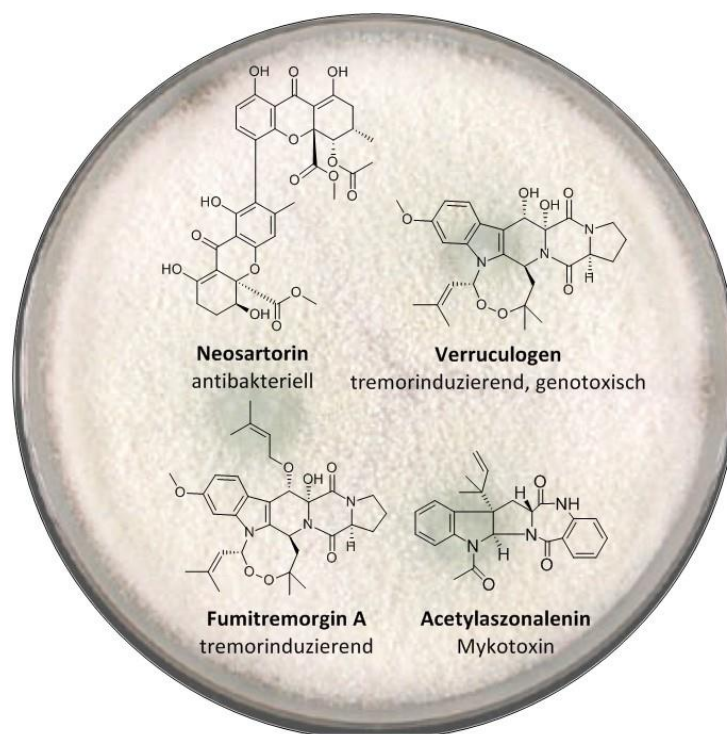
**Abb. 1-1: *Aspergillus nidulans* Kultur auf Festmedium mit ausgewählten Sekundärmetaboliten und deren biologischer Aktivität.** Das Bild setzt sich folgendermaßen zusammen aus: einer Kulturplatte links (Kück *et al.*, 2009), oben rechts: einem Cleistothecium und unten rechts einem Konidienträger von <http://www.asperweb.co.uk/images/species>. Die Angabe der biologischen Aktivität von Anidulafungin (Kofla & Ruhnke 2011) und Sterigmatocystin (Barnes *et al.*, 1994) sind unterhalb der Strukturen dargestellt.

Das Genom von *A. nidulans* FGSC A4 wurde 2005 vollständig sequenziert und annotiert (Galagan *et al.*, 2005). Es umfasst 30,2 Mb, welche sich auf 8 Chromosomen verteilen. Es konnten insgesamt 10,597 putative Gene identifiziert werden. Ausserdem erfolgte bereits die

Zuordnung von 46 mögliche Sekundärmetabolit-Gencluster, die ihrerseits 11 putative Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und 6 Prenyltransferasen der Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS)-Superfamilie beinhalten (Khaldi *et al.*, 2010).

### 1.2.3 *Neosartorya fischeri*

*Neosartorya fischeri* (*N. fischeri*) ist ebenfalls ein weit verbreiteter Schimmelpilz, der sich durch seine saprophytische Lebensweise auszeichnet. Aufgrund seiner beschriebenen Hitzetoleranz der Ascosporen stellt er ein Kontaminationsrisiko für Lebensmittel dar, die während ihrer Herstellung nur pasteurisiert werden. Aufgrund des Vorkommens auf Obst, betrifft dies beispielsweise Fruchtsäfte (Beuchat 1986). Auch *N. fischeri* gilt als Produzent verschiedenartiger Mykotoxine (Abb. 1-2), insbesondere von Fumitremogin A - C, Verruculogen und Verruculogen TR-2 (Nielsen *et al.*, 1988; Samson *et al.*, 2007), sowie Acetylaszonalenin, Fiscalin, Fischerin, Fumigacin, Neosartorin, Sarcin, Terrein, Tryptoquivalin A und Trypacidin (Samson *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009b).



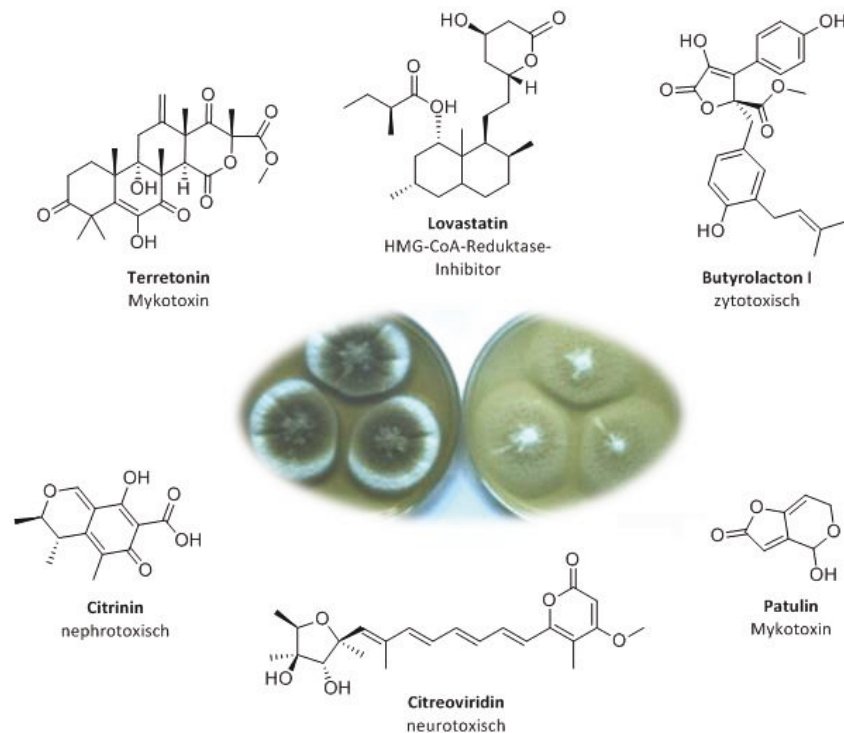
**Abb. 1-2: *Neosartorya fischeri* Kultur auf Festmedium mit ausgewählten Sekundärmetaboliten (Samson *et al.*, 2007).** Die biologischen Aktivitäten für Fumitremogin A und Verruculogen (Frisvad *et al.*, 2009; Mundt *et al.*, 2012; Sabater-Vilar *et al.*, 2003), sowie für Neosartorin (Ola *et al.*, 2014) und für Acetylaszonalenin (Li 2010) sind unterhalb der Strukturen dargestellt.

Speziell die Fumetremorgine können bei Säugetieren tremorartige Symptome oder Krämpfe hervorrufen (Larsen *et al.*, 2007). Infektionen durch *N. fischeri* beschränken sich auf Beschreibungen von Einzelfällen. Darunter fallen Belege für mykotische Keratitis, sowie Endokarditis (Coriglione *et al.*, 1990; Summerbell *et al.*, 1992) und pulmonaler Aspergillose bei immunsupprimierten Transplantations-Patienten (Lonial *et al.*, 1997). Von *N. fischeri* ist auch die anamorphe Form (Nebenfruchtform) unter der Bezeichnung *Aspergillus fischerianus* bekannt, diese tritt vornehmlich bei Temperaturen um 37°C auf, während die sexuelle Form (Hauptfruchtform) *N. fischeri* vorwiegend bei 25 °C vorliegt (Samson *et al.*, 2007).

Das Genom von *N. fischeri* NRRL181 konnte 2008 erfolgreich sequenziert und annotiert werden (Fedorova *et al.*, 2008). Demnach besitzt es eine Größe von 31,77 Mb, die wie bei *A. nidulans* auf 8 Chromosomen angeordnet sind. Die Gesamtzahl der putativen Gene wird auf 10,678 beziffert, zudem konnten 39 mögliche Sekundärmetabolit-Gencluster erfasst werden, die wiederum 19 putative NRPS und 10 Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie (Khaldi *et al.*, 2010) einschließen.

#### **1.2.4 *Aspergillus terreus***

*Aspergillus terreus* (*A. terreus*) stellt hinsichtlich seiner Bedeutung ein zweischneidiges Schwert dar. Zum einen ist er wie bereits erwähnt nicht mehr aus der industriellen Produktion von pharmazeutisch relevanten Substanzen, wie Lovastatin oder der Kunststoffindustrie durch die Herstellung von Itaconsäure wegzudenken (Kück *et al.*, 2009; Sahm *et al.*, 2013). Auf der anderen Seite ist er jedoch auch als opportunistischer Erreger der Aspergillose bekannt und besitzt hierbei eine klinische Häufigkeit von bis zu 12,5 % an den auftretenden Fälle (Iwen *et al.*, 1998; Lass-Flörl *et al.*, 2005; Steinbach *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2003). Zudem ist er Amphotericin B resistent, womit eine deutliche Beschneidung der Behandlungsmöglichkeiten einhergeht (Walsh *et al.*, 2003). Er stellt außerdem auch einen bedeutenden Mykotoxin- und Sekundärmetabolitproduzenten dar (Abb. 1-3), wie beispielsweise von Aspulvinonen, Asterriquinonen, Asterrenin, Butyrolaktone, Citreoviridin, Citrinin, Geodin, Gliotoxin, Patulin, Isoterrin, Terretonin und Territremin (Machida & Gomi 2010; Samson *et al.*, 2011).



**Abb. 1-3: *Aspergillus terreus* Kultur auf Festmedium mit ausgewählten Sekundärmetaboliten.**

Aus: <http://www.asperweb.co.uk/images/species>. Die biologischen Aktivitäten von Terretonin und Butyrolacton I (Guo *et al.*, 2012). Citrinin (Boruta & Bizukojc 2014), Citreoviridin (Franck & Gehrken 1980), Lovastatin (Kück *et al.*, 2009), sowie Patulin (Wilson 1976) sind ergänzend zur Struktur dargestellt.

Asterriquinone zeigen beispielsweise zytotoxische und antibakterielle Aktivität oder sind potentielle Insulinrezeptor-Agonisten (Brewer *et al.*, 1984; Tarcz *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 1999) und für Aspulvinone konnte eine Wirkung gegenüber dem Influenza A H1N1-Virus nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2013a).

Das Genom von *A. terreus* konnte 2006 durch das Broad Institute (Cambridge, MA, USA) sequenziert und annotiert werden. Es besteht aus 29,33 Mb verteilt auf 8 Chromosomen. Darüber hinaus verfügt *A. terreus* über 56 putative Sekundärmetabolit-Gencluster, sowie 20 annotierte NRPS und 10 Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie (Khaldi *et al.*, 2010).

## 1.3 Indolalkaloide

### 1.3.1 Allgemeines

Der Begriff Alkaloide umfasst stickstoffhaltige Verbindungen des Sekundärmetabolismus bakteriellen, pflanzlichen oder pilzlichen Ursprungs, die dabei auf aromatischen Ausgangsverbindungen des Primärstoffwechsels beruhen können, insbesondere Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Anthranilsäure. Aber auch die Aminosäuren Lysin oder Ornithin, die sich durch Ringschlüsse beispielsweise für die Bildung von Pyrrol-; Pyrrolidin-; Pyrrolizidin- und Piperidinalkaloiden verantwortlich zeichnen, spielen eine bedeutende Rolle. Namensgebend für die Alkaloide ist ihre basische Natur in wässriger Umgebung und zur Einteilung in die jeweiligen Alkaloidtypen ist der Aufbau des Stickstoff-Heterozyklus Grundgerüsts entscheidend. Die nachstehenden Indolalkaloide zeichnen sich durch das Vorhandensein eines Indol-Grundgerüsts aus und leiten sich überwiegend von der Aminosäure L-Tryptophan ab (Abb. 1-4).

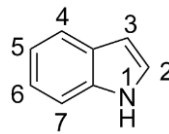


Abb. 1-4: Indol-Grundgerüst

### 1.3.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen

Die Biosynthese prenylierter Indolalkaloide beruht auf der Kombination der Aminosäure L-Tryptophan mit terpenoiden Vorstufen, dabei insbesondere Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Diese hybriden Naturstoffe stammen überwiegend aus Pflanzen, Bakterien, sowie Pilzen und zeigen nicht zuletzt aufgrund der Prenylierungen eine außerordentliche strukturelle Diversität (Abb. 1-5). Die Prenylierung als solches führt auch zur Erhöhung der biologischen Aktivität der Indolalkaloide (Botta *et al.*, 2005; Wallwey & Li 2011).

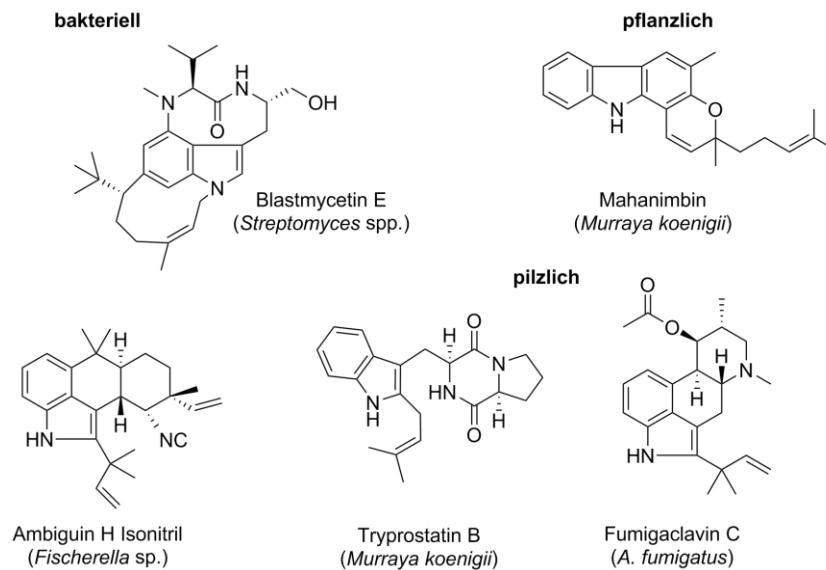
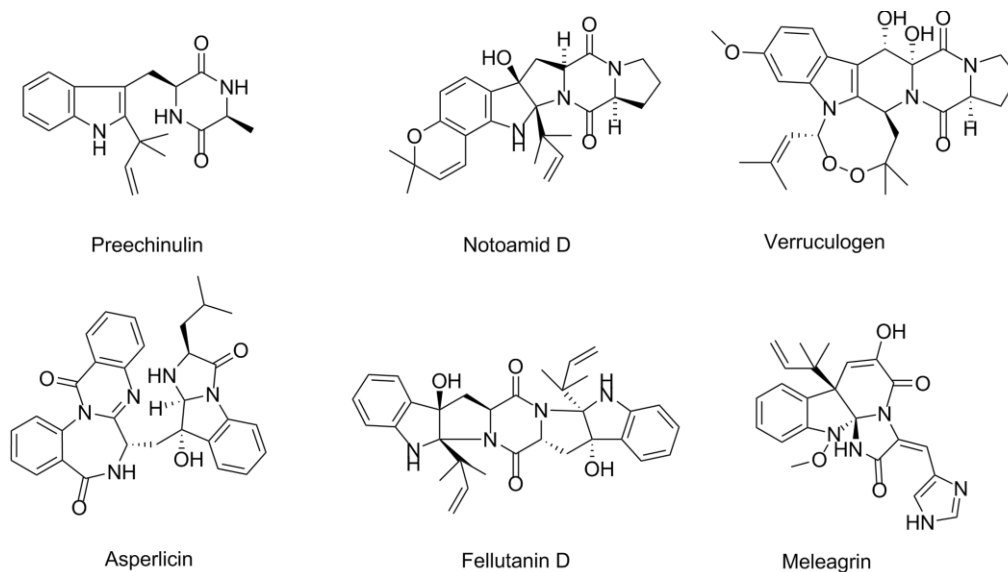


Abb. 1-5: Strukturen einiger ausgewählter prenylierter Indolalkaloide unterschiedlichen Ursprungs (Li 2010).

Bezogen auf die Ascomycota sind insbesondere die Familien der Clavicipitaceae und Trichocomaceae bedeutende Produzenten von prenylierten Indolalkaloiden (Li 2010; Ruiz-Sanchis *et al.*, 2011). Neben der zugrundeliegenden Aminosäure L-Tryptophan spielen in der Biosynthese von Indolalkaloiden noch weitere Aminosäuren eine Rolle. Dabei gibt es drei Wege um an benötigte Aminosäuren zu gelangen. Diese können entsprechend im Primärmetabolismus synthetisiert werden, am Beispiel des Tryptophan über eine Verzweigung des Shikimatweges, aus der Umgebung bezogen werden oder aus der Degradation unbenötigter Proteine resultieren (Goldman & Osmani 2007; Williams *et al.*, 2000). Die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren zur Biosynthese eines Indolalkaloids mit Peptidgrundgerüst erfolgt durch Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS). Diese synthetisieren oftmals zyklische Dipeptide mit einer Diketopiperazinstruktur oder dessen Derivate. Bei dieser Reaktion wird häufig L-Tryptophan mit einer weiteren Aminosäure, zuweilen auch einem zweiten Tryptophan-Molekül verknüpft. Auf diese Weise wird der Grundstein für verschiedenste Sekundärmetabolite gelegt (Abb. 1-6). So konnten zum einen die Fellutanine A bis D aus der Gattung *Penicillium* isoliert werden, die auf besagten zwei L-Tryptophan-Molekülen basieren (Kozlovsky *et al.*, 2000; Kozlovsky *et al.*, 2001). Eine Vielzahl an zyklischen Dipeptiden und deren Derivate beruhen auf der Verbindung von L-Tryptophan mit L-Prolin, wie die Notamide, Austamide, Stephacidine, Paraherqueramide und auch die Brevianamide (Ding *et al.*, 2010; Li 2010; Stocking *et al.*, 2000; Tsunematsu *et al.*, 2013), welche wiederum die Basis für die Fumitremorgine A - C und Verruculogen darstellen. Im

Zusammenspiel von L-Tryptophan und L-Alanin entstehen die Echinuline und Neoechinuline (Li 2010; Marchelli *et al.*, 1975; Slater *et al.*, 1970). Die Verknüpfung der Aminosäuren L-Tryptophan und L-Histidin bildet den Ausgangspunkt für die Biosynthese des Oxalins, Meleagrins, sowie der Roquefortine und Glandicoline (García-Estrada *et al.*, 2011; Kozlovsky *et al.*, 2013) und die Verbindung von L-Tryptophan und Anthranilsäure wiederum legt den Grundstein für Acetylaszonalenin und Asperlicin (Gao *et al.*, 2013b; Yin *et al.*, 2009b).

Für die Biosynthese der Ergotalkaloide, der Cyclopiazonsäure und der Rugulovasine lässt sich ein anderer Umstand feststellen, hierbei beruht die Struktur im Wesentlichen auf der einzelnen Aminosäure L-Tryptophan und zwar auf 4-Dimethylallyltryptophan (Boichenko *et al.*, 2001; Li 2010; Wallwey & Li 2011). Während dieser Arbeit wurden unter anderem N1-, C3- und C7-prenylierte Indolalkaloide, sowie zyklischen Dipeptide mit O-prenyliertem Tyrosinrest erzeugt und untersucht, diesbezüglich werden diese kurz näher vorgestellt.



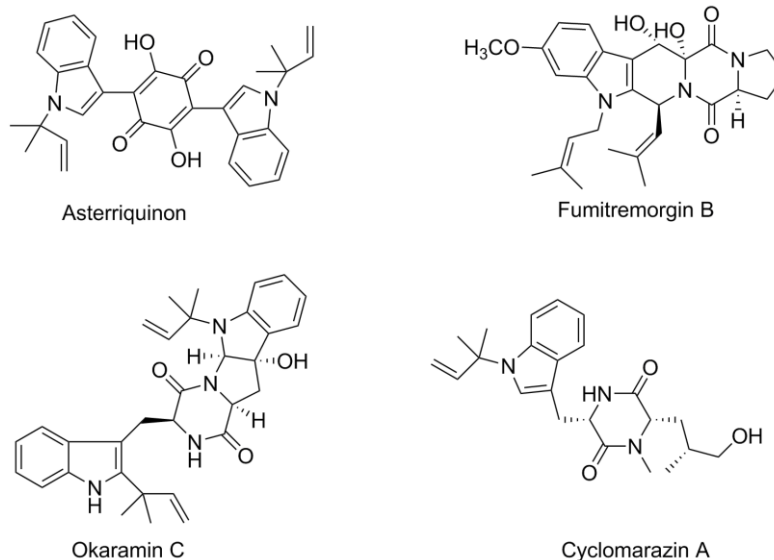
**Abb. 1-6:** Strukturen einiger ausgewählter pilzlicher, prenylierter Indolalkaloide auf der Grundlage von L-Tryptophan in Verbindung mit mindestens einer weiteren aromatischen oder aliphatischen Aminosäure (Li 2010).

### 1.3.3 N1-prenylierte Indolalkaloide

Zu diesen zählt unter anderem Fumitremorgin B (Abb. 1-7), welches durch N-Prenylierung am Indolring von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C durch die Prenyltransferase FtmPT2 in *N. fischeri* und *A. fumigatus* entsteht (Grundmann *et al.*, 2008) oder auch die Okaramine A, C und L, die alle gemeinsam auf die Grundstruktur des *cyclo*-L-N1-DMAT-L-C2-DMAT



zurückzuführen sind und dem Pilz *P. simplicissimum* entstammen (Shiono *et al.*, 1999). Am Beispiel des marinen Actinomyceten *Salinispora aremicola* ist die Prenyltransferase CymD für eine *N*-Prenylierung in der Biosynthese von Cyclomarazin A bzw. Cyclomarin C verantwortlich (Schultz *et al.*, 2010). Zusätzlich fallen aber auch Asterriquinon (Abb. 1-7) und Isoasterriquinon aus *A. terreus* in diese Kategorie (Kaji *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1976). Ein weiterer erwähnenswerter Umstand betrifft die Prenyltransferase CTrpPT, die neben einer regulären C7-Prenylierung eine reverse Prenylierung an Position N1 durchführt, insbesondere bei den Substraten *cyclo*-L-Trp-L-Trp und *cyclo*-L-Trp-L-Phe, während bei Substraten mit geringeren Umsätzen, wie *cyclo*-L-Trp-L-Tyr und *cyclo*-L-Trp-L-Leu noch weitere Nebenprodukte auftreten. Dieser Umstand deutet auf die Abnahme der Regioselektivität durch die Akzeptanz unspezifischer Substrate hin (Substratpromiskuität).



**Abb. 1-7** Strukturen einiger ausgewählter *N1*-prenylierter Indolalkaloide.

### 1.3.4 C3-prenylierte Indolalkaloide

Strukturell zeichnen sich C3-prenylierte Indolalkaloide durch eine multizyklische Ringstruktur aus, welche ebenfalls auf einer Diketopiperazin- oder Benzodiazepindionstruktur beruht. Erst die überwiegend vorkommende reverse Prenylgruppe am Indolinring sorgt hier für einen zusätzlichen Ringschluß zwischen C2 und N12. Das bekannteste Beispiel ist hier Roquefortin C, welches auf die Aminosäuren L-Tryptophan und L-Histidin zurückzuführen ist und in verschiedenen *Penicillium* Arten nachgewiesen werden konnte (Ali *et al.*, 2013; García-Estrada



*et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2006). Aber auch Aszonalenin aus *N. fischeri* (Yin *et al.*, 2009b) oder *A. zonatus* und seine Stereoisomere *epi*-Aszonalenin A und C aus *A. novofumigatus* (Kimura *et al.*, 1982; Rank *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009b) stellen derartige Vertreter dar (Abb. 1-8). Ergänzend dazu, konnte auch 5-*N*-Acetylardeemin in *N. fischeri* und *A. terreus* identifiziert werden (Hochlowski *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 2013). Außerdem handelt es sich sowohl bei Fructigenin A und B um entsprechende *cyclo*-L-Trp-L-Phe-Derivate aus *P. fructigenum* (Arai *et al.*, 1989), als auch im Fall von Nocardioazin B aus dem marinen Actinomyceten *Nocardioopsis* sp. (CMB-M0232) (Raju *et al.*, 2011) und den Bromindolalkaloiden der Flustramine aus dem Moostierchen *Flustra foliacea* (Rochfort *et al.*, 2009) um Mitglieder dieser Gruppe. Nocardioazin B und Flustramin B besitzen hierbei die Besonderheit eines regulären C3-Prenylrestes.

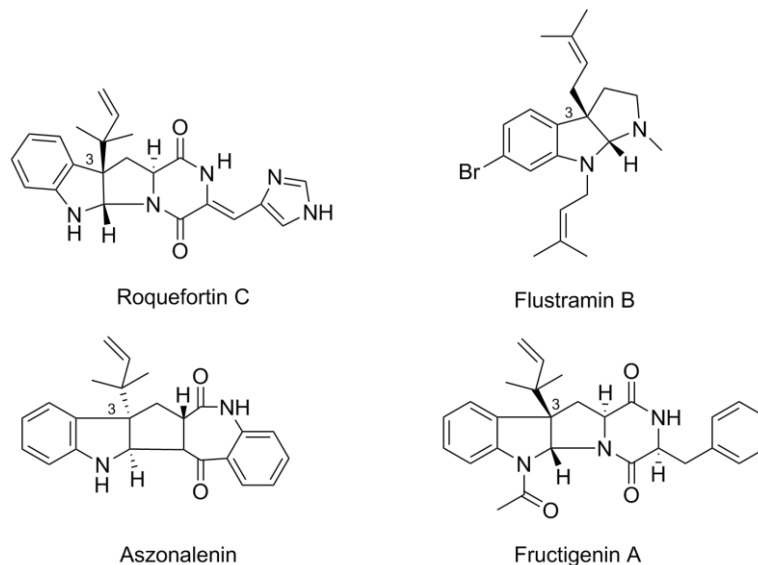


Abb. 1-8: Strukturen einiger ausgewählter C3-prenylierter Indolalkaloide.

### 1.3.5 C7-prenylierte Indolalkaloide

Indolalkaloide dieser Gruppe zeichnen sich hauptsächlich durch das Vorhandensein einer regulären Prenyl-Einheit an Position C7 des Indolringes (Abb. 1-4) aus. Zu ihnen zählen die Echinuline, Astechrom und auch Terezin D (Abb. 1-9). Allen gemein ist ihre Herkunft, sie leiten sich von einem zyklischen Dipeptid bestehend aus L-Tryptophan und der aliphatischen Aminosäure L-Alanin ab. Echinuline besitzen bis zu drei Prenyl-Einheiten an verschiedenen Positionen des Indolringes und konnten aus verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen isoliert

werden (Birch *et al.*, 1961; Stipanovic & Schroeder 1976; Wang *et al.*, 2007). Zu den Vertretern, die auch einen Prenylrest an Position C7 des Indolringes tragen, zählen beispielsweise Echinulin (Slater *et al.*, 1970) und Arestrictin B (Itabashi *et al.*, 2006). Die Echinuline sind auch im Pflanzenreich vorzufinden, dabei unter anderem in den Familien der Cucurbitaceae und Orchidaceae (Talapatra *et al.*, 2001). Beim Sekundärmetabolit Astechrom oder dem resultierenden Dreifachkomplex Hexadehydroastechrom handelt es sich um ein Eisen(III)-Komplexbildner, der als Siderophor fungiert (Yin *et al.*, 2013b). Das zugrunde liegende Sekundärmetabolitcluster wurde in *A. fumigatus* charakterisiert (Yin *et al.*, 2013b) und Orthologe in *N. fischeri* und *A. terreus* identifiziert (Kremer *et al.*, 2007). Als Nebenprodukt dieser Biosynthese entstand auch Terezin D, welches ursprünglich aus dem Pilz *Sporormiella teretispora* isoliert wurde (Wang *et al.*, 1995). Außerdem gibt es auch unter den Asterriquinonen C7-prenylierte Derivate, wie Asterriquinon CT4 aus den Ascomyceten *A. terreus* (Kaji *et al.*, 1994) oder *Humicola grisea* und *Humicola fuscoatra* (Mocek *et al.*, 1996). Aber auch Vertreter mit linearer Peptidstruktur auf Basis von Tryptophan und Valin, wie das Mellamid aus *A. terreus* (Kagamizono *et al.*, 1997) oder *A. melleus* (Ondeyka *et al.*, 2003) können hier eingeordnet werden.

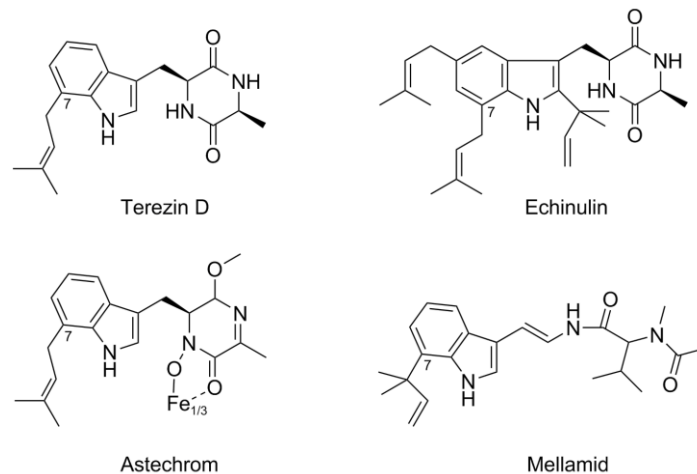


Abb. 1-9: Strukturen einiger ausgewählter C7-prenylierter Indolalkaloide.

## 1.4 Prenyltransferasen

Prenyltransferasen stellen essentielle Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels in allen Domänen des Lebens dar. Sie katalysieren hierbei die Übertragung von Isopreneinheiten auf unterschiedlichste Substrate, die zum einen namensgebend sind und zum anderen in drei Untergruppen eingeordnet werden: die Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen, die Proteinprenyltransferasen und die aromatischen Prenyltransferasen. Das Grundprinzip der Prenylreaktion beruht dabei immer auf der Erzeugung eines Carbeniumions durch Abspaltung des Diphosphates vom einen Substrat, welches daraufhin das zweite Substrat elektrophil angreift.

### 1.4.1 Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen

Im Fall der Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen (IPPS) dienen die Isomere IPP (Isoprenyldiphosphat) und DMAPP als Ausgangsprodukte zur Kondensation zu einem linearen C10-Isopren-Grundgerüst, dem Geranyldiphosphat (GPP, C10), dieses wird durch fortlaufende Elongation mit IPP (C5) zum Farnesyldiphosphat (FPP, C15) und anschließend zum Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, C20) erweitert. Je nach Ebene stellen sie somit die linearen Isopren-Grundgerüste für eine Vielzahl von abgeleiteten Isoprenoidverbindungen, wie den Terpenoiden, Steroiden, Carotenoide, Retinoide oder auch für Proteinprenyltransferasen bereit (Wang & Ohnuma 2000). Je nach Konfiguration der erhaltenen Produkte werden *cis*- und *trans*-IPPS unterschieden (Ogura & Koyama 1998), wobei beide zur Durchführung ihrer Reaktion Magnesium benötigen, sich aber im Aufbau ihrer aktiven Zentren unterscheiden. Bei *trans*-IPPS befinden sich zwei aspartatreiche Motive (DDXXD), die unter Mitwirkung von Magnesium zur Koordinierung der Prenyldiphosphate beitragen (Tarshis *et al.*, 1994), während *cis*-IPPS lediglich über einzelne Aspartatreste zur Koordinierung des Substrates und Abspaltung des Diphosphates verfügen (Liang *et al.*, 2002). Hierbei komplexiert das Magnesium zunächst mit dem IPP und erst anschließend koordiniert dies an der Diphosphatgruppe des Akzeptormoleküls und ermöglicht dessen Abspaltung (Liang 2009; Takahashi & Koyama 2006). *Trans*-IPPS sind beispielsweise an der Biosynthese der Ubichinon-Seitenkette oder auch der Ether-verknüpften Lipide der Archaeen beteiligt. *Cis*-IPPS fungieren unter anderem als Lipid-Carrier in der Peptidoglycan-Biosynthese der Bakterien oder in ähnlicher Weise bei der Glycoprotein-Biosynthese der Eukaryoten (Liang *et al.*, 2002).

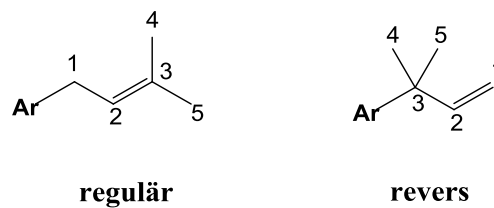
### 1.4.2 Proteinprenyltransferasen

Proteinprenyltransferasen verwenden wiederum FPP oder GGPP zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Diese Proteine werden damit in die Membran integriert und dienen überwiegend der Signaltransduktion. Die Prenylierung erfolgt über einen am C-terminalen Ende des Proteins befindlichen Cysteinrest (Maurer-Stroh *et al.*, 2003) unter Mitwirkung von Zink. Dieser Cysteinrest ist zudem Teil eines CaaX Motivs, wobei die Aminosäure an Position X über eine Farnesylierung durch eine Farnesyltransferase (Ftase) oder Geranylgeranylierung mittels Geranylgeranyltransferase (GGTase) bestimmt (Zverina *et al.*, 2012). Prenylierungen erfolgen hierbei an Ras-, Rab-, sowie weiteren GTP-bindenden Proteinen und Proteinkinasen (Roskoski 2003). Ras-Proteine werden einfach durch die GGTase I prenyliert, während Rab-Protein aufgrund zwei auftretender Erkennungsmotive doppelt durch die GGTase II prenyliert werden. Diese Proteine können zudem weitere lipophile Modifikationen durch Methylierung und Palmitoylierung erhalten (Gelb *et al.*, 2006).

### 1.4.3 Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische Prenyltransferasen übertragen entsprechend ihrer Bezeichnung allylische Isopreneinheiten auf ein aromatisches Substrat, wobei die Vielfalt der aromatischen Substrate mit einer entsprechenden Vielzahl von aromatischen Prenyltransferasen einhergeht. Sie sind somit verantwortlich für die Biosynthese diverser Primär- und insbesondere Sekundärmetabolite. Als Prenyldonatoren finden überwiegend DMAPP (C5), GPP (C10) und FPP (C15) ihre Anwendung. Zu den aromatischen Prenyltransferasen zählen hierbei sowohl membrangebundene, als auch lösliche Proteine, sowie Metallionen-abhängige, als auch vollständig unabhängige Vertreter. Dennoch haben alle gemein, dass häufig mit Ausführung ihrer jeweiligen Reaktion auch eine Zunahme der biologischen Relevanz zu verzeichnen ist (Botta *et al.*, 2005; Wollinsky *et al.*, 2012b; Yu & Li 2012) und den einheitlichen Reaktionsablauf der Prenylierung. Am Anfang steht jeweils die Abspaltung des Diphosphates vom Prenyldonor. Das entstandene Kation kann anschließend je nach Lokalisation der positiven Ladung regulär über das C1 oder revers über das C3 durch den entsprechenden nucleophilen Angriff des Aromaten übertragen werden (Abb. 1-10). Hierbei sind Prenylierungen an aromatischen Kohlenstoff- oder Stickstoffatomen möglich, aber auch an aromatisch gebundenen Hydroxy- oder Thiolgruppen (Fan *et al.*, 2014; Rudolf & Poulter 2013).

Anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und Aminosäuresequenzen lassen sie sich in mindestens vier nachfolgend beschriebene Gruppen einteilen.

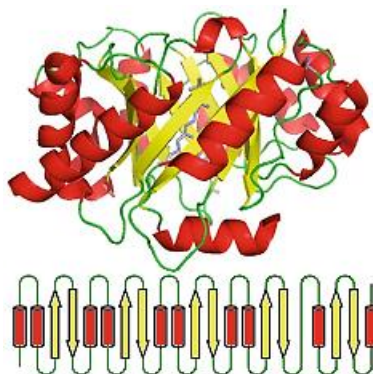


**Abb. 1-10: Reguläre und reverse Prenyleinheiten.** Abkürzungen: Ar, Aromat.

#### 1.4.3.1 Prenyltransferasen der UbiA-Superfamilie

Membrangebundene Prenyltransferasen kommen sowohl in Bakterien, als auch in Pilzen und Pflanzen vor und stehen oft im Zusammenhang mit dem Primärstoffwechsel und sind dort beispielsweise in der Biosynthese der Ubichinone Menachinone, sowie Plastochinone involviert. Enzyme dieser Gruppe akzeptieren diverse aromatische Substanzen, wobei ihre Reaktion von der Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  oder ähnlichen divalenten Metallionen abhängig ist (Ohara *et al.*, 2006; Ohara *et al.*, 2009). Ausserdem verfügen sie über hoch konservierte (N/D)DXXD-Motive, die für die Koordinierung des Prenyldiphosphates notwendig sind. Zu den charakterisierten Mitgliedern dieser Gruppe zählen die aromatischen Prenyltransferasen UbiA aus *Escherichia coli* (*E. coli*) und COQ2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), welche eine zentrale Rolle in der Ubichinon- und Menachinon-Biosynthese spielen (Ashby *et al.*, 1992; Melzer & Heide 1994; Nakagawa *et al.*, 2010). In den letzten Jahren konnten weitere Mitglieder der UbiA-Superfamilie identifiziert werden, welche an der Biosynthese verschiedener Sekundärmetabolite beteiligt sind. Hierzu zählen zum Beispiel SfN8DT (Sasaki *et al.*, 2008), SFG6DT und SfiLDT (Sasaki *et al.*, 2011), welche wesentliche Bedeutung für die Flavonoid-Biosynthese in *Sophora flavescens* (*S. flavescens*) besitzen, sowie LePGT1 aus *Lithospermum erythrorhizon* (*L. erythrorhizon*), das bei der Shikonin-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt (Ohara *et al.*, 2013; Yazaki *et al.*, 2002). Weitere aufzuführende Vertreter sind unter anderem GmG4DT aus *Glycine max* (*G. max*) mit Beteiligung an der Biosynthese von Phytoalexinen (Akashi *et al.*, 2009) und AuaA aus der Aurachin D-Biosynthese in *Stigmatella aurantiaca* (*S. aurantiaca*) (Stec *et al.*, 2011).

### 1.4.3.2 Prenyltransferasen der PT-barrel-Superfamilie



**Abb. 1-11: PT-barrel-Faltung der aromatischen Prenyltransferasen** (Kuzuyama *et al.*, 2005; Saleh *et al.*, 2009b). Stellvertretend ist die Struktur von NphB aus *Streptomyces* sp. mit 10 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und 10 umfassenden  $\alpha$ -Helices dargestellt.

Die Prenyltransferasen der PT-barrel-Superfamilie oder auch ABBA-Prenyltransferasen umfassen lösliche Enzyme, sowohl pilzlichen, als auch bakteriellen Ursprungs und werden aufgrund von Gemeinsamkeiten in ihrer Tertiärstruktur in dieser Kategorie zusammengefasst. Durch die fünffache Abfolge von  $\alpha\beta\alpha$ -Sekundärstrukturelementen bildet sich durch die antiparallele Anordnung der zehn  $\beta$ -Faltblätter, das sogenannte *PT-barrel* (Abb. 1-11), welche das Reaktionszentrum umschließt und durch die  $\alpha$ -Helices nach außen abgeschirmt wird (Jost *et al.*, 2010; Tello *et al.*, 2008). Als erster Vertreter ist hier NphB einzuordnen (Kuzuyama *et al.*, 2005), aber durch weiterführende Strukturaufklärungen auch die Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie, wie FgaPT2, FtmPT1, AnaPT und CdpNPT (Jost *et al.*, 2010; Metzger *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

#### 1.4.3.2.1 Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe

Die Vertreter dieser Gruppe sind lösliche Enzyme und katalysieren die Prenylierung diverser Substanzen, wie Naphthalin- oder Chinon-Derivate und Phenazine (Heide 2009). Das erste Mitglied, dessen Funktion aufgeklärt werden konnte, ist CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes* (*S. roseochromogenes*). CloQ und sein Ortholog NovQ aus *Streptomyces niveus* (*S. niveus*) sind für die Prenylierung von 4-Hydroxyphenylpyruvat verantwortlich (Ozaki *et al.*, 2009; Pojer *et al.*, 2003). Als Endprodukte der jeweiligen Biosynthesen entstehen im Fall

von CloQ Clorobiocin und bei NovQ Novobiocin. Weitere Mitglieder sind NphB von *Streptomyces* sp. und das Homolog SCO7190 aus *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*), die in Anwesenheit der Prenyldonatoren GPP und DMAPP 1,6-Dihydroxynaphthalin als Substrat akzeptieren (Kumano *et al.*, 2008; Kuzuyama *et al.*, 2005), sowie die beiden Phenazin-Prenyltransferasen EpzP aus dem Streptomyceten *S. cinnamonensis* (Seeger *et al.*, 2011) und PpzP aus *S. anulatus* (Saleh *et al.*, 2009a; Zocher *et al.*, 2012). Weiterhin sind auch Fnq26 aus *S. cinnamonensis* und Fur7 aus *Streptomyces* sp. zu erwähnen, welche an der Biosynthese von Furanonaphthochinon I bzw. Furaquinocin beteiligt sind (Haagen *et al.*, 2007; Kumano *et al.*, 2010) und jeweils GPP als Prenyldonor verwenden. Mittlerweile sind auch farnesylierende Verteter identifiziert worden. Zu ihnen zählen DzmP aus dem Bakterium *Micromonospora* sp. RV115 und ein Ortholog Ssrg\_00986 aus *Streptomyces griseoflavus* (*S. griseoflavus*), die an der Biosynthese des prenylierten Benzodiazepinderivates Diazepinomicin mitwirken (Bonitz *et al.*, 2013). Auch das pilzliche Mitglied Ptf<sub>AT</sub> aus *A. terreus* und seine Orthologe Ptf<sub>Bf</sub> und Ptf<sub>Ss</sub> aus *Botryotinia fuckeliana* (*B. fuckeliana*) und *Sclerotinia sclerotiorum* (*S. sclerotiorum*) sind hier einzuordnen (Haug-Schifferdecker *et al.*, 2010). Sämtliche Mitglieder dieser Gruppe zeigen keine Sequenzähnlichkeiten zu den membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen auf und ihre Aktivität ist, mit Ausnahme von NphB, unabhängig von divalenten Metallionen. Ausserdem verfügen sie auch nicht über aspartatreiche (N/D)DxxD-Motive (Tello *et al.*, 2008).

#### 1.4.3.2.2 Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie

Bei sämtlichen Mitgliedern dieser Familie handelt es sich um lösliche Prenyltransferasen, die überwiegend die Prenylierung von Indolderivaten katalysieren und aus Ascomyceten stammen (Yu & Li 2012). Dabei spielen sie sowohl eine entscheidende Rolle bei der Produktion von biologisch-aktiven Sekundärmetaboliten, als auch von diversen Mykotoxinen. Sämtliche Prenyltransferasen dieser Familie besitzen weder aspartatreiche Motive noch benötigen sie divalente Metallionen bei der Durchführung ihrer Reaktionen. Bezugnehmend auf die erste charakterisierte 4-Dimethylallyltryptophansynthase (4-DMATS) aus der Ergotalkaloid-Biosynthese von *Claviceps purpurea* (Tsai *et al.*, 1995) wurden und werden alle weiteren Enzyme mit eindeutigen Sequenzidentitäten zu diesem Urtyp dieser Familie zugeordnet. Mit der wachsenden Anzahl von Genomsequenzen konnten zahlreiche neue Prenyltransferasen identifiziert werden, die unterschiedlichste Indolderivate akzeptieren. So konnte

beispielsweise 2005 eine weitere 4-DMATS aus *A. fumigatus* beschrieben werden (Unsöld & Li 2005). Mittlerweise konnten bereits für jede Position am Indolring (N1 und C2 - C7) entsprechende Prenyltransferasen identifiziert und charakterisiert werden (Yu & Li 2012). Dabei können sie nochmals gesondert in Tryptophan-akzeptierende Prenyltransferasen und in jene die überwiegend Tryptophan-haltige zyklische Dipeptide akzeptieren, unterschieden werden. Aber auch die Akzeptanz von Bisindolyl-Benzochinonen, die nicht auf der Kondensation zweier Tryptophanmoleküle beruhen, sondern auf der Dimerisation der abgeleiteten  $\alpha$ -Ketosäure Indol-3-pyruvat durch ein NRPS-ähnliches Enzym konnte belegt werden (Tarcz *et al.*, 2014a). In der Zwischenzeit sind aber auch Prenyltransferasen konstatiert, die Substanzen ohne Indol-Grundgerüst, wie Tyrosin und dessen Derivate (Fan *et al.*, 2014; Kremer & Li 2010) oder auch Xanthone (Pockrandt *et al.*, 2012; Tarcz *et al.*, 2014b) prenylieren (Tab. 1-1). Zahlreiche dieser Enzyme zeigen dabei eine breite Substratspezifität und zudem eine regiospezifische Prenylierung auf (Yu & Li 2012). Die Reaktionen sind dabei aber auch stereospezifisch, wie es im Fall der C3-Prenyltransferasen AnaPT, CdpNPT und CdpC3PT für unterschiedliche Substrate erfolgreich belegt wurde (Yu *et al.*, 2013). Weiterführend konnte für einige Mitglieder auch die Akzeptanz von gänzlich unnatürlichen Substraten, wie Hydroxynaphthalinen, Indolocarbazolen oder Flavonoiden nachgewiesen werden (Yu *et al.*, 2012a; Yu *et al.*, 2011; Yu & Li 2011). Am Beispiel von AnaPT aus *N. fischeri* (Yin *et al.*, 2009a) konnte neben der Prenylierung von zyklischen Dipeptiden auch die Akzeptanz von Hydroxynaphthalinen beobachtet werden und für AstPT aus *A. terreus* (Tarcz *et al.*, 2014b) zusätzlich die von Hydroxyxanthonen, dies aber ebenso unter Verwendung der Prenyldonatoren GPP und FPP (Tarcz *et al.*, 2014b). AnaPT ist zudem nicht nur in der Lage zyklische Dipeptide mit DMAPP zu prenylieren, sondern auch in Gegenwart von GPP zu geranylieren (Pockrandt & Li 2013), wie das in ähnlicher Weise durch PAPT aus *P. amygdali* praktiziert wird, hierbei können Prenylreste von DMAPP oder GPP auf Fusicoccine übertragen (Noike *et al.*, 2012) werden, wobei das natürliche Substrat Fusicoccin P nur mittels DMAPP prenyliert wird. Weiterhin verwendet das Enzym VrtC aus *Penicillium aethiopicum* (*P. aethiopicum*) ebenso GPP bei der Prenylierung von Naphthacendionen (Chooi *et al.*, 2012). Demnach zeigen sich einige Prenyltransferasen auch für andere Prenyldonatoren empfänglich. Mitunter werden durch Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie darunter CdpNPT, CdpC3PT, AnaPT, BrePT, 5-DMATS, FgaPT2 und FtmPT1 aber auch unnatürliche Prenyldonatoren, wie 2-Pentenylidiphosphat und Methylallyldiphosphat verwendet (Liebhold



*et al.*, 2012; Liebhold *et al.*, 2013), in Verbindung mit FgaPT2 auch Benzyldiphosphat (Liebhold & Li 2013). Im Umkehrschluss zeigen einige Prenyltransferasen ebenso eine Akzeptanz für nicht-natürliche Substrate, wie *cyclo*-L-Homotryptophan-L-Valin (Fan & Li 2013). Zugleich können nicht nur aromatische Kohlenstoff- oder Stickstoffatome zur Prenylierung dienen, sondern auch phenolische Hydroxyl- oder auch Thiolgruppen. Dieser Umstand wird durch die Prenyltransferasen SirD aus *L. maculans* oder auch von TyrPT aus *A. niger* ausgenutzt (Fan *et al.*, 2014; Kremer & Li 2010).

Die Gesamtheit all dieser Eigenschaften und Möglichkeiten prädestinieren die Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie geradezu als Werkzeuge für die chemoenzymatischen Synthese neuer Produkte (Li 2010; Yu & Li 2012).

**Tab. 1-1: Übersicht über die bereits biochemisch charakterisierten PTasen der DMATS-Superfamilie und deren natürliche Substrate.**

Protein	Organismus	Aromatisches Substrat	Prenyl-donor	Referenz
<b>DmaW</b> (AAC18893)	<i>Claviceps fusiformis</i> ATCC 26245	L-Tryptophan	DMAPP	(Tsai <i>et al.</i> , 1995)
<b>FgaPT2</b> (AAX08549/3I4Z)	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	L-Tryptophan	DMAPP	(Unsöld & Li 2005)
<b>FtmPT1</b> (AAX56314/3O2K)	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Grundmann & Li 2005)
<b>FgaPT1</b> (XP_756136)	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	Fumigaclavin A	DMAPP	(Unsöld & Li 2006)
<b>7-DMATS</b> (ABS89001)	<i>Aspergillus fumigatus</i> B5233	L-Tryptophan	DMAPP	(Kremer <i>et al.</i> , 2007)
<b>CdpNPT</b> (ABR14712/4E0U)	<i>Aspergillus fumigatus</i> B5233	zyklische Dipeptide	DMAPP	(Yin <i>et al.</i> , 2007)
<b>DmaW-Cs</b> (AAZ29613)	IslaF13 (Clavicipitaceae)	L-Tryptophan	DMAPP	(Markert <i>et al.</i> , 2008)
<b>TdiB</b> (ABU51603)	<i>Aspergillus nidulans</i> RLMH37	DDAQD	DMAPP	(Schneider <i>et al.</i> , 2008b)
<b>FtmPT2</b> (EU622826)	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	12,13-Dihydroxy-fumitremorgin C	DMAPP	(Grundmann <i>et al.</i> , 2008)
<b>MaPT</b> (EU4200091)	<i>Malbranchea aurantiaca</i> RRC1813	L-Tryptophan	DMAPP	(Ding <i>et al.</i> , 2008)
<b>AnaPT</b> (EAW16181/4LD7)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181	( <i>R</i> )-Benzodia-zepindion	DMAPP	(Yin <i>et al.</i> , 2009b)
<b>CpaD-Ao</b> (XP_001821505)	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	<i>cyclo</i> -Acetoacetyl-L-tryptophan	DMAPP	(Liu & Walsh 2009)
<b>CpaD-Af</b> (XP_002379958)	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	<i>cyclo</i> -Acetoacetyl-L-tryptophan	DMAPP	(Liu & Walsh 2009)

Protein	Organismus	Aromatisches Substrat	Prenyl-donor	Referenz
<b>CdpC3PT</b> (EAW17508)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181	zyklische Dipeptide	DMAPP	(Yin <i>et al.</i> , 2010b)
<b>CTrpPT</b> (GU722589)	<i>Aspergillus oryzae</i> DSM1147	zyklische Dipeptide	DMAPP	(Zou <i>et al.</i> , 2010)
<b>NotC</b> (ADM34131)	<i>Aspergillus</i> sp. MF297-2	6-Hydroxydesoxy-brevianamid E	DMAPP	(Ding <i>et al.</i> , 2010)
<b>NotF</b> (ADM34132)	<i>Aspergillus</i> sp. MF297-2	cyclo-L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Ding <i>et al.</i> , 2010)
<b>SirD</b> (AAS92554)	<i>Leptosphaeria maculans</i>	L-Tyrosin	DMAPP	(Kremer & Li 2010)
<b>5-DMATS</b> (EAW08391)	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL1	L-Tryptophan	DMAPP	(Yu <i>et al.</i> , 2012b)
<b>FtmPT3</b> (EAW19377)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	Verruculogen	DMAPP	(Mundt <i>et al.</i> , 2012)
<b>PAPT</b> (BAL68129)	<i>Phomopsis amygdali</i> Niigata-2	Fusicoccin P	DMAPP, GPP	(Noike <i>et al.</i> , 2012)
<b>VrtC</b> (ADI24928)	<i>Penicillium aethiopicum</i> IBT 5753	Naphthacendione	GPP	(Chooi <i>et al.</i> , 2012)
<b>Nf112230</b> (EAW20699) unter Bezeichnung <b>NscD</b>	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	Naphthacendione Anthracenone	DMAPP	(Chooi <i>et al.</i> , 2012) (Chooi <i>et al.</i> , 2013)
<b>Mc03599</b> (EEQ30780)	<i>Microsporum canis</i>	Naphthacendione	DMAPP	(Chooi <i>et al.</i> , 2012)
<b>Tt06703</b> (EGD99349)	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Naphthacendione	DMAPP	(Chooi <i>et al.</i> , 2012)
<b>XptB</b> (BN001302)	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxymethyl-xanthon	DMAPP	(Pockrandt <i>et al.</i> , 2012)
<b>ArdB</b>	<i>Aspergillus fischeri</i> ATCC 96284	Ardeemin FQ	DMAPP	(Haynes <i>et al.</i> , 2013)
<b>BrePT</b> (AFM09725)	<i>Aspergillus versicolor</i> NRRL 573	cyclo-L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Yin <i>et al.</i> , 2013a)
<b>CdpC2PT</b> (EAW25546)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	zyklische Dipeptide	DMAPP	(Mundt & Li 2013)
<b>BAE61387</b>	<i>Aspergillus oryzae</i> DSM 1147	Hydroxy-naphthaline	DMAPP, GPP, FPP	(Pockrandt <i>et al.</i> , 2014)
<b>AstPT</b> (EAU29429)	<i>Aspergillus terreus</i>	Asterriquinone	DMAPP	(Tarcz <i>et al.</i> , 2014a)
<b>7-DMATS<sub>Neo</sub></b> (EAW21275)	<i>Neosartorya</i> sp. 3134	L-Tryptophan	DMAPP	(Miyamoto <i>et al.</i> , 2014)
<b>TyrPT</b> (CAK41583)	<i>Aspergillus niger</i>	L-Tyrosin	DMAPP	(Fan <i>et al.</i> , 2014)

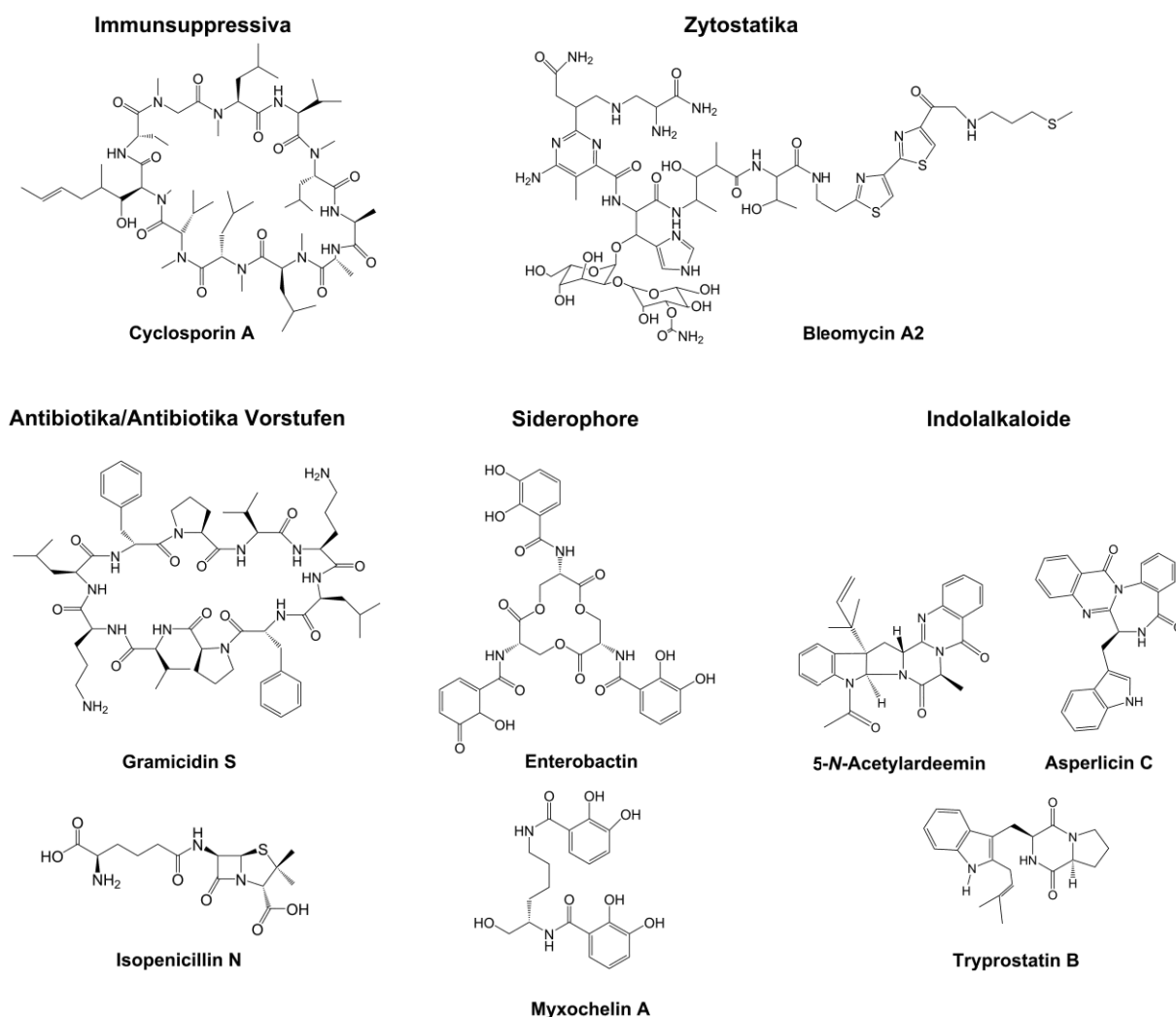
Angegeben ist der Proteinname mit NCBI-Zugriffsbezeichnung und die PDB-ID, falls eine Struktur verfügbar ist. Die Proteine sind in chronologischer Reihenfolge ihrer ersten Veröffentlichung aufgelistet. Die Abkürzung DDAQD steht für Didemethylasterriquinon D.

### 1.4.3.3 Prenyltransferasen der LtxC-Gruppe

Prenyltransferasen der LtxC-Gruppe erhalten ihre Bezeichnung in Anlehnung an LtxC aus *Lyngbya majuscula* (*L. majuscula*), welches unter der Verwendung von GPP die Reaktion von (-)-Indolactam V zu Lyngbyatoxin (Edwards & Gerwick 2004) katalysiert. Es handelt sich hierbei um lösliche Proteine, die bakteriellen Ursprungs sind und als eine Art Verbindungsglied zwischen der CloQ/NphB-Gruppe und der DMATS-Superfamilie fungieren (Takahashi *et al.*, 2010). Obwohl sie nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu den Mitgliedern der DMATS-Superfamilie aufzeigen, sind sie in der Lage Indolderivate als Substrate zu verwenden und verfügen möglicherweise auch über die *PT-barrel*-Struktur (Bonitz *et al.*, 2011). Inbegriffene Vertreter dieser Gruppe sind CymD von *Salinispora arenicola* (*S. arenicola*), SCO7467 von *S. coelicolor* und IptA von *Streptomyces* sp. SN-593, welche die Prenylierung von L-Tryptophan an Position N-1, C-5 und C-6 katalysieren (Ozaki *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010). Auch die kürzlich charakterisierten 6-Dimethylallyltryptophansynthasen aus *Streptomyces ambofaciens* (*S. ambofaciens*) und *Streptomyces violaceusniger* (*S. violaceusniger*) sind dieser Gruppe zugehörig (Winkelblech & Li 2014). Diese sind zudem auch in der Lage GPP als Prenyldonor zu akzeptieren.

## 1.5 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) bilden gemeinsam mit Polyketidsynthetasen (PKS), Hybridenzymen aus beiden Gruppen (NRPS/PKS-Hybride), sowie NRPS-ähnlichen Enzymen (NRPS-like) die Grundlagen für eine Vielzahl von bakteriellen und pilzlichen Sekundärmetaboliten. Speziell NRPS stellen hier sogenannte Nichtribosomale Peptide (NRPs) her, welche die Ausgangspunkte für auch pharmazeutisch-relevante Substanzen, wie Immunsuppressiva, Antibiotika oder Zytostatika darstellen. Einige ausgewählte Strukturen sind in Abb. 1-12 dargestellt.



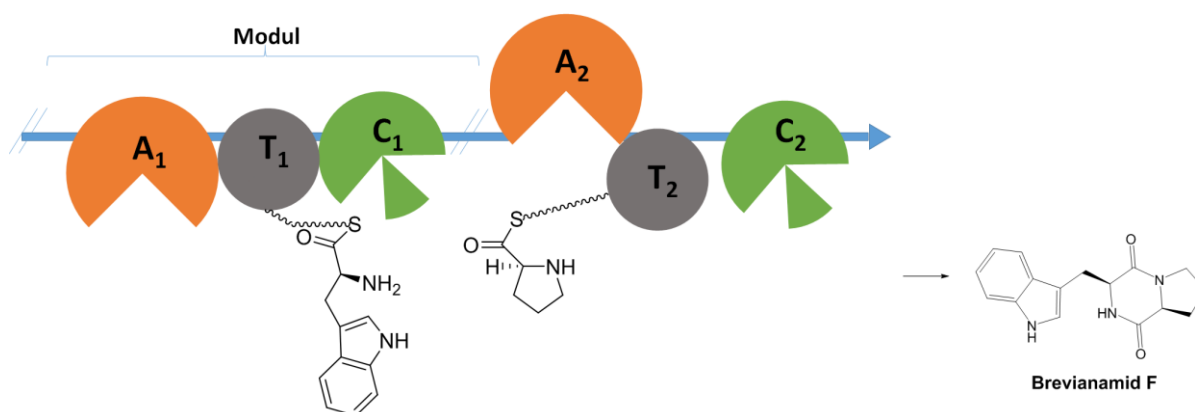
**Abb. 1-12:** Einige ausgewählte Strukturen, die auf der Biosynthese durch eine NRPS zurückzuführen sind.

Über die Produktion solcher Verbindungen, verfolgen die Mikroorganismen das Ziel sich einen Vorteil gegenüber im Habitat befindlicher Konkurrenten zu verschaffen (Stone & Williams 1992). Dazu zählt unter anderem die Antibiotikabiosynthese, wie die Produktion von Isopenicillin N und die darauf beruhenden Antibiotika der Penicillin- und Cephalosporin-Familie (Abb. 1-12), aber auch andere antibiotisch-wirkende Substanzen, wie Gramicidin S (Hori *et al.*, 1989; Turgay *et al.*, 1992), Tyrocidin A (Mootz & Marahiel 1997) oder Vancomycin (van Wageningen *et al.*, 1998). Ein weiterer entscheidender Vorteil besteht beispielsweise in der Produktion von Siderophoren, die der Komplexierung von zellumgebenden Eisen(III)-Ionen dienen und zur entsprechenden Versorgung beitragen (Crosa & Walsh 2002), da Eisen einen wichtigen Cofaktor für zahlreiche Enzyme, insbesondere der Atmungskette darstellt. Zu den bekanntesten Beispielen zählen die Bactine, unter anderem Enterobactin (Challis & Naismith 2004; Drake *et al.*, 2006) oder auch Bacillibactin (Schwarzer *et al.*, 2003), sowie

Myxochelin A (Li *et al.*, 2008). Kürzlich konnte auch die Biosynthese des ursprünglich in *A. terreus* identifizierte Astechrom bzw. Hexadehydroastechrom in *A. fumigatus* aufgeklärt werden (Yin *et al.*, 2013b). Interessanterweise sind einige Ascomyceten in der Lage auch heterologe Siderophore anderer Organismen aufzunehmen um an das benötigte Eisen zu gelangen (Haas *et al.*, 2003). Desweiteren stammen auch die Zytostatika Epithilon (Höfle *et al.*, 1996) und Bleomycin A2, sowie das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Keller *et al.*, 2005) aus der Biosynthese durch entsprechende NRPSs.

Anders als bei bakteriellen NRPS steht bei pilzlichen Vertretern nicht die Biosynthese makrocyclischer Verbindungen im Vordergrund, sondern eher die Bereitstellung von überwiegend zyklischen Dipeptiden für die Biosynthese darauf aufbauender Indolalkaloide (Abb. 1-12), wie Tryprostatine, Fumitremorgine, Notamide, Aszonalenine, sowie Roquefortin C und Meleagrin (Li 2010; Xu *et al.*, 2014). Zudem beruht die Biosynthese der NRPs, auch bei größere Verbindungen, wie Cyclosporin A auf der Katalyse von lediglich einer NRPS, während die bakterielle Vorgehensweise oft auf die Beteiligung mehrerer NRPS zurückzuführen ist (Hoffmeister & Keller 2007; Schwarzer *et al.*, 2003).

Trotz der enormen Vielfalt der NRPs und der resultierenden Funktionsvielfalt beruhen sie doch alle auf dem Grundprinzip eines einfachen modularen Aufbaus einer NRPS (Abb. 1-13). Die verschiedenen Module der NRPS sind für den Einbau spezifischer Aminosäuren in das Endprodukt verantwortlich (Keller *et al.*, 2005; Marahiel *et al.*, 1997; von Döhren *et al.*, 1997), dies können neben den 20 proteinogenen Aminosäuren auch nicht-proteinogene Aminosäuren oder deren Derivate sein. Mittlerweile sind mehr als 500 mögliche Monomere dokumentiert (Caboche *et al.*, 2010).



**Abb. 1-13: Darstellung einer bimodularen NRPS zur Erzeugung von Brevianamid F.** Dargestellt sind die aktivierten Aminosäuren unmittelbar vor der Kondensation.

Jedes dieser Module ist eine eigene Funktionseinheit und kann in einzelne Domänen unterteilt werden (Stachelhaus & Marahiel 1995). Ein charakteristisches NRPS-Modul besteht immer aus der Adenylierungsdomäne, der Thiolierungsdomäne und der Kondensationsdomäne. Neben diesen können noch weitere Modifikationsdomänen zur Diversifikation durch Methylierung, Oxidation, Reduktion, Epimerisierung und Hydroxylierung vorhanden sein (Mootz *et al.*, 2002; Pohlmann & Marahiel 2008). Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) ist hierbei für die spezifische Aktivierung einer Aminosäure unter Verbrauch von ATP verantwortlich. Die Spezifität beruht auf sogenannten *core motifs*, beziehend auf die Muster der ersten Kristallstruktur einer Adenylierungsdomäne, nämlich von PheA der Gramacidinsynthetase GrsA (Conti *et al.*, 1997). Durch die Charakterisierung immer weiterer NRPS konnten für bestimmte Substrate entsprechende Muster lokalisiert werden, die zum sogenannten NRPS-Code, bestehend aus 10 Aminosäureresten führten (Kalb *et al.*, 2013). Dieser ermöglicht nun über einen bioinformatischen Ansatz (Röttig *et al.*, 2011) eine Vorhersage hinsichtlich der Substratspezifität für nicht-charakterisierte Enzyme. Pilzliche Enzyme zeigen dennoch eine höhere Variabilität bei bestimmten Substraten (Kalb *et al.*, 2013). Dieser Nachteil könnte aber durch weitere Charakterisierungen von pilzlichen NRPS überwunden werden (Xu *et al.*, 2014). Im Anschluss an die Aktivierung der Aminosäure wird diese in Form eines Thioesters auf die prosthetische Gruppe der Thiolierungsdomäne (T- oder PCP-Domäne-*peptidyl carrier protein*) übertragen. Bei dieser Gruppe handelt es sich um 4'-Phosphopantethein, welches posttranslational in Gegenwart von Coenzym A durch eine Phosphopantetheinyltransferase auf einen konservierten Serinrest der T-Domäne übertragen wurde. Erst durch diesen Schritt geht die NRPS von ihrer *apo* in ihre *holo*-Form über (Schwarzer *et al.*, 2003). Das gebundene Intermediat wird nun zur Kondensationsdomäne (C-Domäne) überführt, an der die Peptidbindung mit der zweiten aktivierten Aminosäure geknüpft wird. So entsteht eine wachsende Peptidkette, die wiederum an der Terminations- oder Thioestersedomäne (TE-Domäne) durch intramolekulare Zyklisierung oder abschließende Hydrolyse freigesetzt wird (Xu *et al.*, 2014). Bei pilzlichen NRPS besteht hingegen die Annahme, dass 60 - 90 % der NRPS einen anderen Prozess durchlaufen (Gao *et al.*, 2012). Hierbei vermittelt die terminale C-Domäne (C<sub>T</sub>) die intramolekulare Zyklisierung des Peptides, wobei die vorhergehende Thiolierungsdomäne auch einen entscheidenden Einfluß auf die Präsentation und Erkennung durch die terminale Kondensationsdomäne besitzt (Gao *et al.*, 2013b). Dies ist beispielsweise bei den charakterisierten NRPS TqaA aus der Fumiquinazolin F-Biosynthese oder durch AspA

aus der Asperlicin-Biosynthese belegt worden. Dieser sukzessive Verlauf von Domäne zu Domäne erinnert dabei stark an Arbeitsabläufe an einem Fließband, daher fällt auch oft der prägende Begriff "*assembly line*" im Zusammenhang mit der Funktionsweise einer NRPS.

NRPS werden entsprechend ihrem Aufbau und ihrer modularen Abfolge in lineare (Typ A), iterative (Typ B) und nicht-lineare NRPS (Typ C) unterteilt (Mootz *et al.*, 2002). Im Fall der linearen NRPS entspricht die Anzahl und Reihenfolge der Module direkt der Peptidsequenz. So entsteht beispielsweise Brevianamid F (Maiya *et al.*, 2006), der Vorläufer der Fumitremorgine und Notamide (Li 2010). Beim Typ B besteht ebenfalls der lineare Ablauf, jedoch werden einige Module mehrfach durchlaufen. Demzufolge können auch größere Produkte erhalten werden, als die Anzahl der Module vorgibt. Ein Beispiel für die Indolalkaloide wäre hier die Biosynthese von Asperlicin C und D, hierbei wird die erste Adenylierungdomäne zweimal mit Anthranilsäure beladen und mit Tryptophan verknüpft (Gao *et al.*, 2013b). Der dritte Typus, die nicht-lineare NRPS, lässt anhand der Anordnung und Anzahl keine Rückschlüsse auf die Peptidsequenz zu, unter Umständen finden sich aber ungewöhnliche Domänenabfolgen, wie im Fall der Yersiniabactin-Synthetase. Hier gibt es ein abnormes Modul in der Abfolge Cy-Mt-PCP (Zyklisierungsdomäne-Methyltransferasedomäne-Thiolierungsdomäne). Hier ist also die Adenylierungsdomäne gegen eine Methylierungsdomäne ausgetauscht (Crosa & Walsh 2002; Gehring *et al.*, 1998), der biokatalytische Reaktionsmechanismus ist daher auf den ersten Blick nicht erkennbar.

Durch die gezielte Kombination von ausgewählten NRPS-Genen mit Genen modifizierender Enzyme, insbesondere mit Prenyltransferasen können aufgrund der breiten Substratspezifität der Prenyltransferasen neue Naturstoffe auch heterolog erhalten werden. Die prenylierten Derivate weisen dabei zumeist eine höhere biologische Aktivität als ihre unprenylierten Vorläufer auf, wie es im Fall von Brevianamid F und Tryprostatin B (Jain *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 1998; Wollinsky *et al.*, 2012a) bestätigt werden konnte.

## 1.6 NRPS-ähnliche Enzyme

NRPS-ähnliche (NRPS-like) Enzyme treten überwiegend in Pilzen auf und besitzen in ihrem modularen Aufbau die Domänenstruktur (A-T-TE) in einfacher Ausführung (Balibar *et al.*, 2007). Typischerweise ist keine Kondensationsdomäne vorzufinden, demnach kann auch keine Peptidbindung zwischen den aktivierten Substraten geknüpft werden. Der erste charakterisierte Vertreter war die Bisindolylbenzochinonsynthetase TdiA aus *A. nidulans* (Bok *et al.*, 2006), die in der Biosynthese von Terrequinone A zwei  $\alpha$ -Ketosäuren, hier Indolpyruvat über eine doppelte Claisen-Condensation verknüpft. Dabei wird demzufolge zweimal das identische Substrat aktiviert, eines verbleibt als Thioester an der Thiolierungsdomäne und das zweite als Ester an der Thioesterase-Domäne. Es kommt anschließend zur Chinonbildung und Freisetzung des Produktes.

Es finden sich auch bereits einige weiterer beschriebene Vertreter, wie AtrA aus *Tapinella panuoides* (Schneider *et al.*, 2008a) oder MicA aus *A. nidulans* mit Beteiligung in der Biosynthese von Atromentin und Microperfuranon (Yeh *et al.*, 2012). Diese Gruppe umfasst auch Mitglieder mit einer außergewöhnlichen Terminationsdomäne. Beispielsweise besitzen LnaA und LnbA aus *A. flavus* eine Reduktase- anstelle der Thioesterase-Domäne mit einer Substratspezifität für L-Tyrosin. Auch ATEG\_03630 aus *A. terreus* besitzt diesen strukturellen Aufbau akzeptiert jedoch 5-Methylorsellinsäure (Wang & Zhao 2014).



## 2 Zielsetzung für die vorliegende Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

### Charakterisierung der Prenyltransferasen CdpC7PT, EAU34068, EAU36097, EAU33872 und EAU38487 aus *A. terreus*

Die entsprechenden Gene *ATEG\_04218* (*cdpC7PT*), *ATEG\_04999*, *ATEG\_02823*, *ATEG\_06111* und *ATEG\_01730* aus dem Ascomyceten *A. terreus* DSM 1958 sollten heterolog in *E. coli* exprimiert und der abgeleiteten Genprodukte EAU36020 (*CdpC7PT*), EAU34068, EAU36097, EAU33872 und EAU38487 biochemisch charakterisiert werden.

Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- » Amplifikation von *ATEG\_04218*, *ATEG\_04999*, *ATEG\_02823*, *ATEG\_06111* und *ATEG\_01730* aus cDNA oder gDNA von *A. terreus* unter Kontrolle oder Einbeziehung der vorhergesagten Intron-Exon-Struktur
- » Klonierung in das pQE-Expressionssystem mit darauffolgender Expression in *E. coli* und Aufreinigung des überproduzierten Proteins
- » Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität
- » Isolierung und Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte, sowie Bestimmung der kinetischen Parameter der jeweiligen katalytischen Reaktion

### Untersuchungen zu den putativen Nichtribosomalen Peptidsynthetasen EAA61517 und EAW25548 aus den Ascomyceten *A. nidulans* und *N. fischeri*, sowie zum NRPS-ähnlichen Enzym EAU36364 aus *A. terreus*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die putativen Nichtribosomalen Peptidsynthetasen EAA61517 und EAW25548, sowie das NRPS-ähnliche Enzym EAU36364, jeweils kodiert durch *AN9226* aus *A. nidulans*, *NFIA\_043670* aus *N. fischeri* und *ATEG\_03090* aus *A. terreus* in *A. nidulans* TN02A7 exprimiert werden. Durch Isolierung und Strukturaufklärung der akkumulierten Sekundärmetabolite sollten Rückschlüsse auf mögliche natürliche Substrate der ebenfalls im Cluster befindlichen Prenyltransferasen erhalten und die Aufklärung potentieller Biosynthesewege ermöglicht werden. Insbesondere das NRPS-Gen *NFIA\_043670* befindet sich mit der Prenyltransferase *CdpC2PT* in einem putativen Cluster zur Fellutanin-Biosynthese und sollte zur Bestätigung dieser Hypothese beitragen (Mundt & Li 2013).

Folgende Arbeiten sollten durchgeführt werden:

- » Amplifikation von *AN9226*, *NFIA\_043670* und *ATEG\_03090* aus gDNA von *A. nidulans*, *N. fischeri* und *A. terreus* unter Einbindung von Promotor- und Terminatorbereichen
- » Klonierung in ein geeignetes Transformations- und Expressionskonstrukt (pJW24)
- » Transformation in die auxotrophen *Aspergillus*-Stämme *A. nidulans* TN02A7 oder *A. niger* AB 1.13
- » Selektion potentieller Transformanten
- » Verifizierung der genomischen Integration der Gene mittels PCR
- » Vergleichende HPLC-Analysen des Sekundärmetabolitspektrum der Transformanten mit dem untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7
- » Isolierung und Strukturaufklärung potentieller zugehöriger Sekundärmetabolite

Koexpression des NRPS-Gens *ftmPS* aus *N. fischeri* mit dem Prenyltransferasegen *cdpNPT* *in vivo* und Analyse der Sekundärstoffakkumulation in den Transformanten

Die *in vivo* Biosynthese von *cyclo*-L-Trp-L-Pro katalysiert durch die homologe NRPS FtmA aus *A. fumigatus* konnte bereits belegt werden (Maiya *et al.*, 2006; Maiya *et al.*, 2009). In dieser Arbeit sollte zum einen die Produktion von Brevianamid F durch ein Homolog aus *N. fischeri* optimiert und durch gezielte Koexpression mit dem Prenyltransferasegen *cdpNPT* (*Af8g00620*) die Sekundärstoffproduktion analysiert werden.

Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- » Amplifikation der kodierenden Sequenz von *NFIA\_093690* aus gDNA von *N. fischeri*
- » Erstellung eines Expressionsvektors mit enthaltenem konstitutiven Promotor und Terminatorbereich für *A. nidulans* TN02A7
- » Transformation und heterologe Expression von *ftmPS* in *A. nidulans* TN02A7
- » Screening der Transformanten und Strukturaufklärung des durch FtmPS produzierten Sekundärmetaboliten
- » Modifikation von pHL5 (*cdpNPT*) für die Verwendung in einem eukaryotischen Expressionssystem durch konstitutiven Promotor, Terminator und Selektionsmarker
- » Transformation zur heterologen Koexpression von *ftmPS* und *cdpNPT* in *A. nidulans* TN02A7
- » Selektion und Kultivierung erhaltener Transformanten, sowie Analyse der Sekundärmetabolite mit Isolierung und Strukturaufklärung der Produkte

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme

#### 3.1.1 Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) bezogen. Bei der Herstellung von Kulturmedien wurden vorwiegend Bestandteile der Firmen Applichem (Darmstadt) und BD (Heidelberg) verwendet. DMAPP, GPP und FPP wurde innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, DMAPP von Frau Lena Ludwig und sowohl GPP als auch FPP von Frau Dr. Edyta Stec. Zyklische Dipeptide, wie *cyclo*-D-Trp-L-Pro und *cyclo*-D-Trp-D-Pro wurden von Frau Dr. Beate Wollinsky und *cyclo*-L-Trp-L-Pro, sowie *cyclo*-L-Trp-D-Pro von Frau Dr. Xia Yu und *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr von Herrn Dr. Hui-Xi Zou synthetisiert und bereitgestellt. Hydroxynaphthaline, Flavonoide und einfache Indolderivate wurde bei den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe), Bachem (Bubendorf, Switzerland), Roth (Karlsruhe), Fluka (Taufkirchen), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und TCI (Eschborn) erworben.

Die speziellen Chemikalien und Medienbestandteile sind in der nachfolgenden (Tab. 3-1) aufgelistet.

**Tab. 3-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile.**

Hersteller	Bezeichnung
Bioline GmbH, Luckenwalde	dNTP Mix 100 mM (jeweils 25 mM)
Eurisotop, Saarbrücken	Chloroform-D1, Methanol-D4, Dimethylsulfoxid-D6
Fermentas, St. Leon-Rot	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactosid (X-Gal)
Roth, Karlsruhe	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid (IPTG), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bis-acrylamid), Natriumdodecylsulfat (SDS) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau R-250
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	2-Mercaptoethanol

### 3.1.2 Materialien zur Chromatographie

Die Säulenmaterialien wurden als Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen.

Tab. 3-2: Chromatographiematerial.

Hersteller	Säulenmaterial
CS Chromatographie Service, Langerwehe	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 4 mm)
	Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 10 mm)
GE Healthcare, Freiburg	HiLoad 16/60 Superdex (Fertigsäule)
	Sephadex G-25 PD-10, NAP-5 (Fertigsäulen)
Machery-Nagel, Düren	Ni-NTA-Agarose (Suspension)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

### 3.1.3 Enzyme und Kits

Tab. 3-3: Enzyme, Größenstandards und Kits.

Hersteller	Bezeichnung
GE Healthcare, Freiburg	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis
Invitrogen, Karlsruhe	SYBR® Safe DNA Gel Stain
Jena BioScience, Jena	Restriktionsendonukleasen, Phosphatasen
	T4-DNA-Ligase
NEB, Ipswich, USA	ProtoScript M-MuLV First Strain cDNA synthesis kit
Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA	E.Z.N.A.™ Fungal RNA Miniprep Kit
Peqlab	Mid Range Polymerase
Promega, Mannheim	pGEM-T Easy Vector System I, Taq DNA Polymerase
Roth, Karlsruhe	RNase A
Roche Applied Science, Mannheim	Expand High Fidelity <sup>Plus</sup> PCR System Plus
	Expand Long Template PCR System
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i> , Lysozym
SLG Südlaborbedarf, Gauting	HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit
Thermo Scientific, Dreieich	GeneRuler DNA Ladder Mix,
	Restriktionsendonukleasen

## 3.2 Plasmide, Primer, Mikroorganismen

### 3.2.1 Plasmide

Tab. 3-4: Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Vektor	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pAS2	Expressionsvektor für <i>A. nidulans</i> TN02A7, Amp <sup>R</sup> , ColE1-Origin, <i>pyroA</i> ; flankierender 5' Bereich von <i>tdiA</i> ; pBluescript SK(-)-Derivat	(Bouhired <i>et al.</i> , 2007)
pGEM-T Easy	Linearisierter Vektor mit einem T-Überhang am 3'-Ende zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang am 3'-Ende, <i>lacZ</i> , <i>ori</i> , <i>f1 ori</i> , Amp <sup>R</sup>	Promega, Mannheim
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan <sup>R</sup> , <i>f1</i> -Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) <sub>8</sub> -tag und C-terminalen (His) <sub>8</sub> -tag; pET28a(+)-Derivat	(Jez <i>et al.</i> , 2000)
pJW24	Expressionsvektor für <i>A. nidulans</i> TN02A7, Amp <sup>R</sup> , ColE1-Origin, <i>pyrG</i> ; pBluescript SK(-)-Derivat	(Calvo <i>et al.</i> , 2004)
pQE-60	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1-Origin, Amp <sup>R</sup> , Sequenz für C-terminalen (His) <sub>6</sub> -tag	Qiagen, Hilden
pQE-70	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , T5-Promotor, ColE1-Origin, Amp <sup>R</sup> , Sequenz für C-terminalen (His) <sub>6</sub> -tag	Qiagen, Hilden
pHL5	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , <i>cdpNPT</i> ( <i>Af8g00620</i> ; EF433418.1, 1-1323) aus <i>A. fumigatus</i> B5233 in pQE-60	(Yin <i>et al.</i> , 2007)

Tab. 3-5: Plasmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt. Die Bezeichnung der Gene *AN9226*, *NFIA\_043670* und *ATEG\_03090* verstehen sich soweit nicht anders erwähnt inklusive eigenem Promotor- und Terminatorbereich.

Plasmid	Beschreibung
pCaW1	Klonierungskonstrukt für <i>AN9226</i> (NT_107001.1; 531768-541221) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, PCR amplifiziertes Fragment (9481 bp; Primer CaW_AN9226-1 und CaW_AN9226-2) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> FGSC A4 kloniert in pGEM-T easy
pCaW2	Klonierungskonstrukt für <i>ATEG_03090</i> (NT_165927.1; 851966 - 855941) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, PCR amplifiziertes Fragment (4002 bp; Primer CaW_03090-1 und CaW_03090-2) aus gDNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958 kloniert in pGEM-T easy
pCaW3	Klonierungskonstrukt für Promotor <i>gpdA<sub>p</sub></i> (AACD01000139; 82580-84032) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, PCR amplifiziertes Fragment (1471 bp; Primer

	CaW_gpdA_for und CaW_gpdA_rev) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> FGSC A4 kloniert in pGEM-T easy
pCaW4	Klonierungskonstrukt für <i>ATEG_04999</i> (NT_165930.1; 182947-184269) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (1284 bp; Primer CaW_04999-1, CaW_04999-2, CaW_04999-3 und CaW_04999-4) aus gDNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958 kloniert in pGEM-T easy
pCaW5	Klonierungskonstrukt für <i>ATEG_02823</i> (NT_165927.1; 121853-123178) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (1276 bp; Primer CaW_02823-1, CaW_02823-2, CaW_02823-3 und CaW_02823-4) aus gDNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958 kloniert in pGEM-T easy
pCaW6	Expressionskonstrukt für <i>ATEG_03090</i> (NT_165927.1; 852504-855035) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, 3990 bp <i>NotI/Spel</i> -Fragment aus pCaW2 kloniert in pJW24
pCaW7	Expressionskonstrukt für <i>ATEG_04999</i> aus <i>A. terreus</i> DSM 1958 (NT_165930.1; 182947-184269), 1273 bp <i>SphI/BamHI</i> -Fragment aus pCaW4 kloniert in pQE-70
pCaW8	Klonierungskonstrukt für <i>ATEG_06111</i> (NT_165931.1; 1343950-1344980) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (985 bp; Primer CaW_06111-1, CaW_06111-2, CaW_06111-3 und CaW_06111-4) aus gDNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958 kloniert in pGEM-T easy
pCaW9	Expressionskonstrukt für <i>ATEG_06111</i> (NT_165931.1; 1343950-1344980) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, 973 bp <i>NcoI/BamHI</i> -Fragment aus pCaW8 kloniert in pQE-60
pCaW10	Klonierungskonstrukt für <i>pyrG</i> , 3147 bp PCR amplifiziertes-Fragment aus pJW24 kloniert in pGEM-T easy
pCaW12	Expressionskonstrukt mit <i>pyrG</i> in pCaW1, 3069 bp <i>Spel</i> -Fragment aus pCaW10 kloniert in pCaW1; Gesamtgröße: 15566 bp
pCaW13	Expressionskonstrukt für <i>AN9226</i> (NT_107001.1; 531768-541221) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, 9467 bp <i>NotI/XbaI</i> -Fragment aus pCaW1 kloniert in pJW24
pCaW14	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043670</i> (NW_001509774.1; 35218-44004) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (8815 bp; Primer CaW_043670-1 und CaW_043670-2) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pCaW15	Expressionskonstrukt für <i>AN9226</i> mit zusätzlichen <i>gpdA</i> -Promotor (AACD01000139; 82580-84032) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, 1460 bp <i>NotI/PmlI</i> -Fragment aus pCaW3 kloniert in pCaW13
pCaW16	Klonierungskonstrukt für <i>ATEG_04218</i> (NT_165928.1; 1888259- 1889466) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (1350 bp; Primer CaW_04999-1, CaW_04999-2, CaW_04999-3 und CaW_04999-4) aus gDNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958 kloniert in pGEM-T easy
pCaW17	Klonierungskonstrukt für <i>ATEG_01730</i> (NT_165925.1; 2079171-2080527) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, Fusions-PCR amplifiziertes Fragment (1350 bp; Primer CaW_01730-1, CaW_01730-2, CaW_01730-3 und CaW_01730-4) aus gDNA von <i>A. terreus</i> DSM 1958 kloniert in pGEM-T easy

pCaW18	Expressionskonstrukt für <i>ATEG_04218</i> (NT_165928.1; 1888259- 1889466) aus <i>A. terreus</i> DSM 1958, 1340 bp <i>NcoI</i> - <i>BglII</i> -Fragment aus pCaW16 kloniert in pQE-60
pCaW19	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_043670</i> (NW_001509774.1; 35218-44004) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 8795 bp <i>XbaI</i> / <i>NotI</i> -Fragment aus pCaW14 kloniert in pJW24
pCaW20	Klonierungskonstrukt für Promotor <i>gpdA<sub>pftmA</sub></i> (AACD01000139; 82580-84032) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, PCR amplifiziertes Fragment (1466 bp; Primer CaW_ <i>gpdApftmA</i> -1 und CaW_ <i>gpdApftmA</i> -2) aus pCaW3 in pGEM-T easy
pCaW21	Expressionskonstrukt für <i>AN9226</i> (NT_107001.1; 531768-541221) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, Deletion von <i>AN9226<sub>p</sub></i> aus pCaW15 (Δ1044 bp; Primer CaW_ <i>gpdA_dAN9226</i> -1, CaW_ <i>gpdA_dAN9226</i> -2)
pCaW23	Klonierungskonstrukt für <i>NFIA_093690</i> (NW_001509764.1; 11995-18633) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, PCR amplifiziertes Fragment (6664 bp; Primer CaW_ <i>ftmPS</i> -1, CaW_ <i>ftmPS</i> -2) aus gDNA von <i>N. fischeri</i> NRRL181 kloniert in pGEM-T easy
pCaW24	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093690</i> (NW_001509764.1; 11995-18633) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 6653 bp <i>XbaI</i> / <i>NotI</i> -Fragment aus pCaW23 kloniert in pJW24
pCaW25	Klonierungskonstrukt für Promotor <i>gpdA<sub>pPT</sub></i> (AACD01000139; 82580-84032) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, PCR amplifiziertes Fragment (1466 bp; Primer CaW_ <i>gpdApPT</i> -1 und CaW_ <i>gpdApPT</i> -2) aus pCaW3 in pGEM-T easy
pCaW26	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093690</i> (NW_001509764.1; 11995-18633) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181; 1459 bp <i>XbaI</i> / <i>PmlI</i> -Fragment ( <i>gpdA<sub>pftmA</sub></i> ) aus pCaW20 kloniert in pCaW24
pCaW27	Klonierungskonstrukt für Terminator <i>trpC<sub>ftmA</sub></i> (E05643; 1-600) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, 619 bp PCR amplifiziertes Fragment (619 bp; Primer CaW_ <i>trpCftmA</i> -1 und CaW_ <i>trpCftmA</i> -2) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> FGSC A4 kloniert in pGEM-T easy
pCaW28	Expressionskonstrukt für <i>NFIA_093690</i> (NW_001509764.1; 11995-18633) aus <i>N. fischeri</i> NRRL181, 608 bp <i>NotI</i> -Fragment ( <i>trpC<sub>ftmA</sub></i> ) aus pCaW27 kloniert in pCaW26
pCaW29	Klonierungskonstrukt für <i>pyroA</i> (AF133101.1; 1-2684 bp) aus <i>Emericella nidulans</i> FGSC A4, PCR amplifiziertes Fragment (2749 bp; Primer KS-Primer und CaW_ <i>pyroA</i> -rev) aus pAS2 kloniert in pGEM-T easy
pCaW30	Klonierungskonstrukt für Terminator <i>trpC<sub>PT</sub></i> (E05643; 1-600) aus <i>A. nidulans</i> FGSC A4, 619 bp PCR amplifiziertes Fragment (621 bp; Primer CaW_ <i>trpCPT</i> -1 und CaW_ <i>trpCPT</i> -2) aus gDNA von <i>A. nidulans</i> FGSC A4 kloniert in pGEM-T easy
pCaW31	Expressionskonstrukt pHL5 für <i>cdpNPT</i> (EF433418.1, 1-1323) aus <i>A. fumigatus</i> B5233 erweitert um ein 1457 bp <i>EcoRI</i> / <i>NcoI</i> -Fragment ( <i>gpdA<sub>pPT</sub></i> ) aus pCaW25
pCaW32	Expressionskonstrukt pHL5 für <i>cdpNPT</i> (EF433418.1, 1-1323) aus <i>A. fumigatus</i> B5233, 606 bp <i>BglII</i> / <i>HindIII</i> -Fragment aus pCaW30 kloniert in pCaW31
pCaW34	Expressionskonstrukt pHL5 für <i>cdpNPT</i> (EF433418.1, 1-1323) aus <i>A. fumigatus</i> B5233, 2714 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pCaW29 kloniert in pCaW32
pCaW34 Stop	Expressionskonstrukt pHL5 für <i>cdpNPT</i> (EF433418.1, 1-1323) aus <i>A. fumigatus</i> B5233, pCaW34 mit Stop-Codon durch die Primer <i>cdpNPTmut</i> -1 und <i>cdpNPTmut</i> -2

### 3.2.2 Primer

**Tab. 3-6: Oligonukleotide.** Fettmarkierte Buchstaben entsprechen mutierten Basen, die zu den kursiv markierten Restriktionsschnittstellen führten. (*Bam*HI: GGATCC, *Bgl*II: AGATCT, *Eco*RI: GAATTC, *Hind*III: AAGCTT, *Nco*I: CCATGG, *Not*I: GCGGCCGC, *Pml*I: CACGTG, *Sal*I: GTCGAC, *Scal*I: AGTACT, *Spe*I: ACTAGT, *Sph*I: GCATGC *Xba*I: TCTAGA, *Xho*I: CTCGAG). Unterstrichene Buchstaben stellen überlappende Bereiche zur Fusion dar.

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/Referenz
CaW_AN9226-1	<b>GCGGCCGCACGTG</b> TTCTTTAGAGATCTTCCTC	pCaW1
CaW_AN9226-2	<b>CTCGAGGTCTAG</b> ATGTCCATATCGCTTTGGG	pCaW1
CaW_03090-1	<b>GCGGCCGCAGTACT</b> GCCTCAATGTCACAAGCCTGG	pCaW2
CaW_03090-2	<b>GCATGCACTAGT</b> AGGTCTGTGGGGACGTGAG	pCaW2
CaW_gpdA_for	CT <b>GCGGCCGC</b> ATTGATCATCCGATAGCTC	pCaW3
CaW_gpdA_rev	GATAC <b>ACGTGGG</b> TGATGTCTGCTCAAGCG	pCaW3
CaW_04999-1	AAGCATGCTCCCCCATCAGACAGC	pCaW4
CaW_04999-2	<u>GATGA</u> ACTCAAGGCGAAATTTCCCAATGTGGATATCT CGCAAACCAAGAA	pCaW4
CaW_04999-3	<u>TTCTTG</u> TTTGCGAGATATCCACATTGGGAAATTTTCGC CTTGAGTTCATC	pCaW4
CaW_04999-4	CCG <b>GATCC</b> CACACGTGCGACATTTTC	pCaW4
CAW_02823-1	GCAGCATGCCGATTCATGATCCGAATGTCTC	pCaW5
CAW_02823-2	<u>TCTGCGCTCGCAGATGTCTT</u> CGCTGGTGTGGACATGT CCATTTCTACTCG	pCaW5
CAW_02823-3	<u>CGAGTAGAAATGGACATGTCCACACCAGCGA</u> AAGACA TCTGCGAGCGCAGA	pCaW5
CAW_02823-4	TG <b>GGATCCT</b> ACTGGCCGGGCGCCTT	pCaW5
CaW_06111-1	A <b>ACCATGGG</b> CACCAACCACAGCGATAATGGG	pCaW8
CaW_06111-2	<u>GATTCCATGCTTTCAAATATGCCATGCCATCGTGGAA</u> GGACAACAAGAA	pCaW8
CaW_06111-3	<u>TTCTTGTTGTCCTTCCACGATGGGCATGGC</u> ATATTTGA AAGCATGGAATC	pCaW8
CaW_06111-4	CTG <b>GATCC</b> CAGACTTCCAGCCTTGGCTGAG	pCaW8
CaW_01730-1	<b>CCGTGACGG</b> ATGACAAAAAGTATCATCGCTTCTG	pCaW17
CaW_01730-2	<u>AAAGACTTGGCTTCAGTTTT</u> CCCAACTGTTGATCTGGG TTCTACCACAAA	pCaW17
CaW_01730-3	<u>TTTGTGGTAGAACCCAGATCAACAGTTGGG</u> AAAACCTG AAGCCAAGTCTTT	pCaW17
CaW_01730-4	GGCTCGAGTCATTTCGATAGACTTCTTCAGAGGCTC	pCaW17
KS-Primer	AT <b>ACTAGTTCTAGAC</b> GAGGTGACGGTATCGA	pCaW10
T3-Primer	CAAGCTCGAAATTAACCTCACTAAAGGGAAC	pCaW10
CaW_043670-1	<b>TCTAGATCAAGCTT</b> ATATCAAAATGGATTATGAA	pCaW14
CaW_043670-2	<b>TATAAGCGGCCG</b> CATGGCTGAATCAAAGTGAT	pCaW14
CaW_04218-1	A <b>ACCATGG</b> CCAACCGCGTGTCTAACG	pCaW16
CaW_04218-2	<u>CAGATGCTGAAAGATATATTT</u> CCCGATGTGGATTTGT CTCAGAGTAGTCG	pCaW16
CaW_04218-3	<u>CGACTACTCTGAGACAAATCCACATCGGG</u> AAATATAT CTTTCAGCATCTG	pCaW16



CaW_04218-4	<b>GCAGATCT</b> CTCTGCTAAGAATTCAGTAGAGCGCG	pCaW16
CaW_gpdApftm A-1	<b>ATTCTAGA</b> ATTGATCATCCGATAGCTCTGC	pCaW20
CaW_gpdApftm A-2	<b>TCACGTG</b> GGTGATGTCTGCTCAAGCGG	pCaW20
CaW_gpdA_dA N9226-1	<u>AGACATCACCATGGCTGTTT</u> CGTACACTAACTTTACGA ATCTACCG	pCaW21
CaW_gpdA_dA N9226-2	<u>AAACAGCCATGGTGATGTCT</u> GCTCAAGCGGGGTAGCT GTTAG	pCaW21
CaW_ftmPS-1	<b>ATTCTAGATCACGT</b> GATGGCACTTGC GG TAGCCGC	pCaW23
CaW_ftmPS-2	<b>TAGCGGCCG</b> CTTAGGTAGCGAATGTATTTCT	pCaW23
CaW_gpdApPT- 1	<b>ATGAATTCA</b> TGATCATCCGATAGCTCTGC	pCaW25
CaW_gpdApPT- 2	<b>TCCATGG</b> GGTGATGTCTGCTCAAGCGG	pCaW25
CaW_trpCftmA- 1	<b>ATGCGGCCG</b> CGGGCCCATGTCAACAAGAATAA	pCaW27
CaW_trpCftmA- 2	<b>TGCGGCCG</b> CCGAGTGGAGATGTGGAGTGGGC	pCaW27
CaW_pyroA-rev	TATCTAGAACTAGTGGATCCAGGAGTATACGGGT	pCaW29
CaW_trpCPT-1	<b>ATAGATCT</b> GGGCCCATGTCAACAAGAATAA	pCaW30
CaW_trpCPT-2	<b>TAGATCTAAGCTT</b> CCGAGTGGAGATGTGGAGTGGGC	pCaW30
cdpNPTmut-1	<u>TGAATGATCTGGGCCC</u> ATGTCAACAAGAATAAAAC	pCaW34
cdpNPTmut-2	<u>ACATGGGCCCAGATCATT</u> CAGGCCAAAAGTAATAT	pCaW34
AN9226-3	CAGGTCCTATCATCGAGCAATG	AN9226
AN9226-4	GGATATTGGTGTCTTACTTGG	AN9226
pyrG-1	GCTACACCACCTACCCTTCC	pCaW13
043670-3	ATGGAGCAGGGTCCGTACGATCT	NFIA_043670
043670-4	AGCCACCCAGGGATATGGCT	NFIA_043670
CaW_03090-4	ATATGGTCTACTGGATCGGATGAAGCCGTCGG	ATEG_03090
CaW_ftmPS_rv2	GCAACATTCTGTCCATTGCACCGT	NFIA_093690

Kontrollprimer\*

\*Kontrollprimer dienen dem Nachweis der Transformation mittels PCR.

### 3.2.3 Mikroorganismen

#### 3.2.3.1 Bakterienstämme

Tab. 3-7: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme.

Anbieter	Bakterienstamm	Genotyp
Invitrogen, Karlsruhe	DH5α	F <sup>−</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK <sup>−</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ <sup>−</sup> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
Qiagen, Hilden	M15 [pREP4]	<i>NaI<sup>S</sup> Str<sup>S</sup> Rif<sup>S</sup> Thi<sup>−</sup> Lac<sup>−</sup> Ara<sup>+</sup> Gal<sup>+</sup> Mtl<sup>−</sup> F<sup>−</sup></i> <i>RecA<sup>+</sup> Uvr<sup>+</sup> Lon<sup>+</sup></i>
Stratagene	XL1-Blue MRF <sup>+</sup>	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup></i> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]
Stratagene	XL10 Gold	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup></i> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]‡

‡ Angegebene Gene bezeichnen Mutanten-Allele. Gene auf dem F Episom, sind unverändert, außer sie sind speziell gekennzeichnet. (Herstellerangabe)

#### 3.2.3.2 Pilzstämme

Tab. 3-8: Übersicht über die verwendeten Pilzstämme.

Referenz	Pilzstamm	Beschreibung
Fungal Genetics Stock Center	<i>A. nidulans</i> A4	Glasgow wild type (veA <sup>+</sup> )
Prof. Berl R. Oakley (Nayak <i>et al.</i> , 2006)	<i>A. nidulans</i> TN02A7	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::argB;</i> <i>riboB2</i>
Prof. Dr. Petra Dersch (Mattern <i>et al.</i> , 1992)	<i>A. niger</i> AB 1.13	<i>cspA1; prt-13; pyrG1</i>
DSMZ, Braunschweig	<i>A. terreus</i> DSM 1958	Wildtyp
Agricultural Research Service Culture Collection of the United States	<i>N. fischeri</i> NRRL181	Wildtyp

### 3.3 Nährmedien und Puffer

#### 3.3.1 Nährmedien

Sämtliche verwendete Medien zur Kultivierung sind nachstehend vermerkt. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 Liter Medium. Bei der Herstellung von Festmedien wurden den Medien 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) hinzugefügt. Die Lagerung der hergestellten Medien erfolgte bei 4 °C.

##### 3.3.1.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Den autoklavierten Medien wurden zur Selektion die jeweiligen Antibiotika (Tab. 3-9) steril zugesetzt.

##### LB-Medium

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

##### TB-Medium

Trypton	12,0 g
Hefeextrakt	24,0 g
Glycerin (≥ 99,5 %)	4,0 ml

Die Bestandteile wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 100 ml TB-Puffer steril zugegeben.

##### TB-Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72 M

Lösung herstellen und autoklavieren.

SOB-Medium

Trypton	20,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	0,60 g
KCl	0,20 g
MgCl <sub>2</sub>	0,95 g
MgSO <sub>4</sub>	2,41 g

SOC-Medium

Trypton	20,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	0,60 g
KCl	0,20 g
MgCl <sub>2</sub>	0,95 g
MgSO <sub>4</sub>	2,41 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurden 20 ml einer sterilen 1 M Glucoselösung steril zugegeben.

**3.3.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von Ascomyceten**

Zur Herstellung der entsprechenden Medien wurden zur Selektion mittels Auxotrophiemarker entsprechende Zusätze (Tab. 3-10) vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Im Fall von Festmedien wurden 1,5 % Agar hinzugegeben.

AMM-Medium

NaNO <sub>3</sub>	6,0 g
Glucose	10,0 g
KCl	0,52 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,52 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, der pH auf 6,5 eingestellt und autoklaviert.

CDH-Medium

Czapex Dox	35,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst und autoklaviert.

GMM-Medium

Glucose	10,0 g
20 x Nitratsalze (Tab. 3-18)	50,0 ml

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, der pH auf 6,5 eingestellt und autoklaviert.

HM-Medium

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glucose	4,0 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, der pH auf 5,5 eingestellt und autoklaviert.

YG-Medium

Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	20,0 g

PD-Medium

Potato Dextrose	24,0 g
-----------------	--------

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst, der pH auf 5,5 eingestellt und autoklaviert.

YPD-Medium

Glucose	20,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
Pepton	20,0 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst und autoklaviert.

PDS-Medium

Potato Dextrose	24,0 g
Saccharose	342,3 g

Alle Bestandteile wurden in bidest. Wasser gelöst und autoklaviert.

### 3.3.2 Antibiotika und Zusätze

#### 3.3.2.1 Antibiotika

Antibiotikallösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert, anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Bei Festmedien fand die Zugabe von Antibiotika unter sterilen Bedingungen nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 60 °C statt.

Tab. 3-9: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konz. der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Konz. der Arbeitslösung [µg/ml]	Hersteller
Carbenicillin	50	Wasser	50	Roth
Chloramphenicol	50	Ethanol	12,5	Roth
Kanamycin	50	Wasser	25	Roth
Tetrazyklin	12,5	Wasser	12,5	Roth

#### 3.3.2.2 Supplementierung bei Verwendung von Auxotrophiemarkern

Tab. 3-10: Verwendete Zusätze (Wachstumsfaktoren).

Zusatz (Supplement)	Endkonzentration [g/l]	Hersteller
L-Arginin	0,5	Roth
Pyridoxin-Hydrochlorid	0,5	Roth
Riboflavin	0,0025	Roth
Uracil	1,0	Acros Organics
Uridin	2,4	Roth

#### 3.3.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Puffer mit bidest. Wasser angesetzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.3.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tab. 3-11: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		Anmerkung
Miniprep-Lösung I	Tris-Base	50 mM	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren. Vor Gebrauch 10 µg/ml RNase A zugeben
	EDTA	10 mM	
Miniprep-Lösung II	NaOH	0,2 M	Nicht autoklavieren
	SDS	1 % (w/v)	
Miniprep-Lösung III	Kaliumacetat	3 M	Auf pH 5,2 einstellen und autoklavieren.
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM	Auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
	EDTA	1 mM	

Tab. 3-12: Puffer und Lösungen zur Isolierung von DNA aus Pilzen.

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
Breaking buffer	NaCl	100 mM
	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	Triton 100	2 % (v/v)
	SDS	1 % (w/v)
	Auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.	
Lysis-Puffer	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	50 mM
	SDS	3 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	1 %
Digestion buffer (DB)	NaCl	100 mM
	Trizma Base	10 mM
	EDTA	25 mM
	SDS	0,5 % (w/v)
Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.		

### 3.3.3.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von *E. coli*

Tab. 3-13: Puffer und Lösungen zur Transformation von *E. coli*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Konzentration
0,1 M CaCl <sub>2</sub> -Lösung	Calciumchlorid	0,1 M
0,1 M CaCl <sub>2</sub> -Lösung (mit Glycerin)	Calciumchlorid Glycerin	0,1 M 15 % (v/v)
10 %ige Glycerin-Lösung	Glycerin	10 % (v/v)
TB-Lösung	PIPES	10 mM
	Calciumchlorid	15 mM
	Kaliumchlorid	250 mM

### 3.3.3.3 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tab. 3-14: Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
50 x TAE-Puffer	Tris-Base	2 M
	Essigsäure 96 %	1 M
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
6 x Ladepuffer	Glycerin	30 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

### 3.3.3.4 Puffer zur Proteinaufreinigung

Tab. 3-15: Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie.

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
Lysepuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	
Waschpuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
	Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.	



Elutionspuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren.		
Proteinlagerungspuffer	Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
	Glycerin	15 % (v/v)
Auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.		
Sämtliche Puffer wurden bei 4 °C gelagert.		

### 3.3.3.5 Puffer und Lösungen zur Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Tab. 3-16: Lösungen und Puffer zur SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Endkonzentration
Trenngel (12 %) Maße: (8 cm × 5,8 cm × 0,75 mm)	Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM
	Rotiphorese® Gel 30	12 % (w/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	bidest. Wasser	ad 5 ml
Sammelgel (4 %) Maße: (8 cm × 1,5 cm × 0,75 mm)	Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
	Rotiphorese® Gel 30	4 % (w/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	bidest. Wasser	ad 5 ml
10 × SDS-Puffer	Tris-Base	250 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	1 % (w/v)
	bidest. Wasser	ad 500 ml
5 × Protein- Probenpuffer (Lagerung: -20 °C)	Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM
	DTT	500 mM
	SDS	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	bidest. Wasser	ad 10 ml

Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau G-250	1 % (w/v)
Coomassie	Essigsäure	10 % (v/v)
	Methanol	50 % (v/v)
	bidest. Wasser	ad 1000 ml
Entfärberlösung	Ethanol	20 %
Coomassie	Essigsäure	10 %
	bidest. Wasser	ad 500 ml

### 3.3.3.6 Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Tab. 3-17: Puffer für die Größenausschlusschromatographie und das Bradford-Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung.

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
FPLC-Puffer	Tris-Base	50 mM
	NaCl	150 mM
Auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren. Lagerung bei 4 °C		
Serva Blau Lösung	Serva Blau G 250	16,4 mM
	Ethanol	ad 50 ml
5 × Bradford Reagenz	Serva Blau Lösung	25% (v/v)
	Phosphorsäure (85 %)	50% (v/v)
	bidest. Wasser	ad 200 ml
Das 5 × Bradford Reagenz wurde über Nacht im Dunkeln bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag über einen Faltenfilter filtriert (Bradford 1976). Die weitere Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4 °C.		

### 3.3.3.7 Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans* TN02A7

Tab. 3-18: Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von *A. nidulans* TN02A7

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Konzentration/Volumen/ Menge
Tween-Lösung	Tween® 20	0,1 % (v/v)
Lösung A für das osmotische Medium	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,1 M
Lösung B für das osmotische Medium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 M

Lösung C für das osmotische Medium	Lösung A	7,0 ml
	Lösung B	93,0 ml
Auf pH 7,9 einstellen und autoklavieren.		
Osmotisches Medium	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 M
	Lösung C	5,0 ml
Auf pH 5,2 einstellen, sterilfiltrieren und Lagerung bei 4 °C.		
Trapping Buffer	Sorbitol	600 mM
	Tris-HCl	100 mM
Auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren und Lagerung bei 4 °C.		
STS Puffer	Sorbitol	1,2 M
	Tris-HCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und Lagerung bei 4 °C.		
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	CaCl <sub>2</sub>	1,0 M
PEG-Lösung	PEG3350	60 % (v/v)
Calcium-PEG-Lösung	1 M CaCl <sub>2</sub>	150 µl
	PEG-Lösung	ad 3 ml
Vor jedem Gebrauch frisch herstellen.		
20x Nitratsalze	NaNO <sub>3</sub>	120,0 g
	KCl	10,4 g
	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10,4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30,4 g
Spurenelemente	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,2 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,1 g
	MnCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,5 g
	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
	CoCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,16 g
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,16 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,11 g
	Na <sub>4</sub> EDTA	5,0 g
	bidest. Wasser	ad 100 ml
Auf pH 6,5 einstellen und sterilfiltrieren.		

---

Bottom-Medium	Czapek Dox	35 g
	Saccharose	0,8 M
	Agar	16 g
Top-Agar	20x Nitratsalze	10 ml
	Spurenelemente	0,5 ml
	Glucose	2 g
	Sorbitol	44 g
	Agar	1,5 g
Auf pH 6,5 einstellen und vor Verwendung auf 40 °C abkühlen lassen.		

---

### 3.4 Bioinformatische Analysen

In dieser Arbeit wurde für die Vorhersage der Intron-Exon-Struktur der Gene vorwiegend die Software FGENESH von Softberry (<http://linux1.softberry.com>) und die *Aspergillus* Comparative Database vom *Broad Institute* (<http://broadinstitute.org>) verwendet. Für den Vergleich und die Auswertung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden die Programme Blast (Basic Local Alignment Search-Tool) und Blast2Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) des *National Center for Biotechnology* (NCBI) herangezogen. Bei Nukleotid-Vergleichen wurde blastn oder blastx verwendet und bei Aminosäuresequenzen wurde auf blastp zurückgegriffen. Für die Multi-Proteinsequenzvergleiche wurde das Programm ClustalW2 genutzt. Die Erstellung von Plasmidkarten erfolgte mittels der Software Genamics Expression (Version 1.1).

### 3.5 Methoden der Mikrobiologie

#### 3.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB- oder TB-Flüssigmedium (3.3.1.1) bzw. auf LB-Agar-Platten bei 37 °C unter Verwendung selektiver Antibiotika (Tab. 3-9). Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm über Nacht (16 h) inkubiert. Zur Optimierung von Expressionsbedingungen erfolgte die Kultivierung auch bei 30 °C für 6 oder 16 h. *E. coli*-Glycerinkulturen wurden durch das Mischen von 800 µl einer stationären Bakterienkultur (16 h) mit 200 µl einer sterilen Glycerin-Lösung (Endkonzentration 20 % v/v) hergestellt und bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.5.2 Kultivierung von Ascomyceten**

#### **3.5.2.1 Kultivierung von *A. nidulans***

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte wenn erforderlich auf oder in AMM-, CDH-, GMM-, HA- oder YG-Medium (Kapitel 3.3.1.2) unter Supplementierung entsprechend den verwendeten Auxotrophiemarkern (Tab. 3-10) bei 30 oder 37 °C im Dunkeln. Auch entsprechende Kluturplatten Flüssigkulturen wurden zusätzlich unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert.

#### **3.5.2.2 Kultivierung von *A. niger***

Die Kultivierung von *A. niger* erfolgte je nach Bedarf auf oder in AMM-, CDH-, oder PD-Medium (3.3.1.3) unter Supplementation entsprechend des verwendeten Auxotrophiemarkers bei 30 °C im Dunkeln. Schüttelkulturen wurden bei 130 rpm angezogen.

#### **3.5.2.3 Kultivierung von *A. terreus***

Die Kultivierung von *A. terreus* erfolgte je nach Bedarf auf oder in AMM-, CDH-, PD-, YPD- und HM-Medium (3.3.1.4) bei 30 oder 37 °C im Dunkeln. Schüttelkulturen wurden bei 130 rpm angezogen.

#### **3.5.2.4 Kultivierung von *N. fischeri***

Die Anzucht von *N. fischeri* wurde in PDS-Flüssigmedium (Kapitel 3.3.1.5) bzw. auf PDS-Platten bei 25 °C im Dunkeln vorgenommen. Erforderliche Flüssigkulturen wurden zusätzlich unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert.

### **3.5.3 Herstellung einer Sporensuspension von Ascomyceten**

Je nach Ausprägung der Sporulation wurde die Sporensuspension von 2-4 Kulturplatten angefertigt. Die Gewinnung der Sporen erfolgte durch die Zugabe von 3 ml einer 0,1 % Tween®-20 Lösung, anschließendem Ablösen der Sporen mittels einer sterilen Impföse und dem Überführen in ein 50 ml Reaktionsgefäß. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und

die erhaltenen Sporensuspensionen vereinigt. Nach Zugabe von 1-2 ml autoklavierten Glasperlen ( $\varnothing$  2,85-3,45 mm), wurde die Suspension ca. 1 min gevortext. Zur Abtrennung von Agar- und Mycelresten erfolgte die Filtration über autoklavierte Watte und darauffolgend die Pelletierung der Sporen bei 3000 x *g* für 3 min. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und die Sporen in 500 µl Glycerin-Lösung (20 % v/v) resuspendiert. Nach dem Aliquotieren wurde die Sporen bei -80 °C gelagert.

## **3.6 Methoden der Molekularbiologie**

### **3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten**

#### **3.6.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion**

Zur Extraktion der genomischer DNA der verschiedenen Ascomyceten erfolgte die Inkubation einer mit Sporen inokulierten 100 ml Standkultur für 4 – 5 Tage im entsprechenden Medium und beim jeweiligen Temperaturoptimum. Das entstandene Mycel wurde vom Medium mittels Zentrifugation bei 5000 x *g* für 5 min getrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der mechanische Aufschluss erfolgte durch Mörsern. 100 mg des Mycels wurden mit DB-Puffer und Proteinase K (0,1 mg/ml) versetzt und für 2 Stunden bei 50 °C unter Schütteln bei 160 rpm inkubiert. Durch die Zugabe von 1 Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) und das Vortexen für den Zeitraum von 1 min konnte nach Zentrifugation bei 14000 x *g* für 5 min und 4 °C eine Phasenbildung beobachtet werden. Die obere wässrige Phase wurde daraufhin von der organischen Phase getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf wurden diese Schritte bis zu 3-mal durchgeführt. Nach Zugabe von 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Volumenteil Isopropanol wurde das Gemisch mehrmals invertiert und für 30 min inkubiert und anschließend bei 14000 x *g* bei 4 °C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mittels 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in autoklaviertem Wasser oder TE-Puffer resuspendiert.

### 3.6.1.2 DNA-Isolierung aus *A. nidulans* TN02A7, *A. niger* AB 1.13 und deren Transformanten

Die Kultivierung erfolgte in geeigneten Medien (100ml) mit den benötigten Zusätzen entsprechend den jeweiligen verwendeten Auxotrophiemarkern für 5 Tage bei 30 °C und 130 rpm im Dunkeln. Das Mycel wurde vom Medium getrennt und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend durch Mörsern pulverisiert. Ca. 100- 200 mg Mycel wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Lysis-Puffer versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation des Gemisches bei 68 °C unter Schütteln erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 14000 x *g* und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0; Carl Roth) unter Vortexen durchmischt. Daraufhin erfolgten eine Inkubationphase von 10 min auf Eis und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die obere wässrige Phase wurde nach nochmaliger Phenol-Chlorform-Behandlung mit 1 Volumenteil Isopropanol versetzt und nach weiteren 10 Minuten Inkubation auf Eis bei 14000 x *g* für 30 min bei 4 °C gefällt. Das Pellet wurde daraufhin mit 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl bidest. Wasser resuspendiert.

### 3.6.2 Isolierung von RNA aus *A. terreus* und Herstellung von cDNA

Zur Isolierung von RNA wurde das Mycel von *A. terreus* DSM 1958 aus einer 100 ml Standkultur (AMM oder PD-Medium, Kapitel 3.3.1.2) gewonnen. Die Kultivierung erfolgte bei 30 oder 37 °C für 3 - 5 Tage im Dunkeln. Das Mycel wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen bei 6000 x *g* und 4 °C für 10 min pelletiert, zweimal mit autoklaviertem bidest. Wasser gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daraufhin erfolgte der mechanische Aufschluß mittels Mörser unter zur Hilfenahme von flüssigem Stickstoffs. Ca. 75 mg pulverisiertes Mycel wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Verfahrensweise erfolgte nach den Herstellervorgaben des E. Z. N. A. Fungal RNA Miniprep Kits (Omega Bio-Tek). Optional wurde auch ein DNase I-Verdau zur Beseitigung von Rückständen genomischer DNA durchgeführt. Abschließend erfolgte die Elution der RNA mit je zweimal 50 µl Nuklease-freiem Wasser. Zur cDNA-Synthese wurde das ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) genutzt. Pro Ansatz wurde 1 µg der isolierten Gesamt-RNA verwendet und nach den Vorgaben des

Herstellers inkubiert. Es wurden sowohl die Oligo d(T)<sub>23</sub>VN-, als auch die Random-Primer des Herstellers verwendet.

### 3.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Einzelkolonien von *E. coli* wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 220 rpm über Nacht in 3 ml LB-Medium mit einem selektiven Antibiotikum kultiviert. Aus einer Übernachtskultur wurden 2 ml der Bakterienkultur entnommen und die Zellen bei 5000 x *g* für 5 min pelletiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl der Miniprep Lösung I (Tab. 3-11) resuspendiert, mit 250 µl der Miniprep Lösung II gemischt (Tab. 3-11) und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl der Miniprep Lösung III (Tab. 3-11) und mehrmaligen Invertieren erfolgte die Inkubation für 10 min auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 17000 x *g* wurde der Plasmid enthaltene lösliche Überstand abgenommen und die Fällung der Plasmid-DNA mittels 600 µl einer eiskalten Isopropanol-Lösung eingeleitet. Durch mehrfaches Invertieren wurde die Plasmid-DNA bei 17000 x *g* für 30 min gefällt, das erhaltene DNA-Pellet mit 700 µl einer eiskalten 70 %igen Ethanol-Lösung gewaschen. Abschließend wurde die Plasmid-DNA für 10 min bei 65 °C getrocknet und in 50 µl autoklaviertem bidest.Wasser rückgelöst.

Bei Maxipräparationen erfolgte eine modifizierte Verfahrensweise. Die ausgewählten einzelnen *E. coli*-Kolonien wurden im Größenmaßstab von 100 ml Schüttelkultur bei 220 rpm, 37 °C über Nacht mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Die weitere Behandlung erfolgte analog zur Minipräparation, jedoch unterscheiden sich die Volumina der einzelnen Miniprep-Lösungen, von Miniprep-Lösung I wurden 5ml, von Miniprep-Lösung II 10 ml und von Miniprep-Lösung III 7,5 ml verwendet. Der erhaltene Überstand wurde durch einen Membranfilter von Proteinrückständen getrennt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte unter Zugabe von einem Volumenteil einer eiskalten Isopropanol-Lösung und anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 11000 x *g* für 45 min. Nach Trocknung bei 60 °C wurde die Plasmid-DNA in 300 µl autoklaviertem bidest. Wasser resuspendiert.



### 3.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden in einem MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, München) oder Labcycler (SensoQuest, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Bei Amplifikaten bis zu einer Größe von 3 kb diente eine Gradienten-PCR mit der *Taq*-Polymerase (Tab. 3-19) zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur für die jeweiligen Primer. Je 10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Kapitel 3.6.5). Anschließend wurde eine PCR mit einer ausgewählten Anlagerungstemperatur mit dem Expand High Fidelity<sup>plus</sup> PCR System (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei erwarteten PCR-Produkten > 3 kb wurde von einer Gradienten-PCR aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten abgesehen und lediglich einige PCR-Ansätze im Bereich der errechneten Anlagerungstemperatur durchgeführt. Bei 3 – 5 kb Amplifikat-Größe wurde das Expand High Fidelity<sup>plus</sup> PCR System (Roche, Mannheim) und bei Größen ≥ 5 kb das Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim) nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Zur Eliminierung von Intronsequenzen wurde eine Fusions-PCR durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die putativen Prenyltransferase-Gene *ATEG\_04218*; *ATEG\_02823*; *ATEG\_06111* und *ATEG\_01730* nach dieser Methode bearbeitet. Diese Gene weisen eine Struktur auf, welche aus 2 Exons mit unterschiedlicher Größe bestehen, die durch eine Intronsequenz voneinander getrennt werden. In einer 1. PCR-Runde erfolgt hierbei die getrennte Amplifikation beider Exons. Durch die Verwendung von geninternen Primer werden an jedem Exon jeweils überlappende Sequenzüberhänge generiert, welche in einer 2. PCR-Runde zur Anlagerung dieser komplementären Bereiche führen und somit ein PCR-Produkt entsteht, bei dem die Intronsequenz entfernt wurde.

Tab. 3-19: Standard-PCR-Ansatz für die *Taq*-Polymerase.

Substanz	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Puffer (10 x)	1 x
dNTP Mix 1:10 (2,5 mM je dNTP)	200 µM je dNTP
Plasmid-DNA/gDNA	10-100/100-300 ng
Primer	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase (1-3 U/µl)	1-3 U
Gesamt-Volumen	50 µl

**Tab. 3-20: Standard-PCR-Ansatz für die Expand High Fidelity<sup>Plus</sup> PCR System bzw. Expand Long Template PCR System.**

Substanz	Endkonzentration
Reaktionspuffer (5 x)	1 x
Nucleotid Mix	200 µM
Plasmid-DNA/gDNA	10-100/100-300 ng
Primer	0,4 µM
<i>Expand High Fidelity</i> -Polymerase (5 U/µl)	2,5 U
Gesamt-Volumen	50 µl

**Tab. 3-21: Standard-PCR-Programm für die Taq-Polymerase (links) und das Expand High Fidelity<sup>Plus</sup> PCR System bzw. Expand Long Template PCR System (rechts).**

Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	3 min	1	94 °C	3 min	1
94 °C	30 s	35	94 °C	30 s	35
T <sub>a</sub>	1-2 min	35	T <sub>a</sub>	1-2 min	35
72 °C	variabel*	35	68-72 °C	variabel*	35
72 °C	7 min	1	68-72 °C	7 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

\* Elongation je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz (1 min/kb). T<sub>a</sub>: Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide.

**Tab. 3-22: Übersicht über die genspezifischen Anlagerungstemperaturen (T<sub>a</sub>).**

Gen	Anlagerungstemperatur
<i>gpdA<sub>p</sub></i>	58 °C
<i>trpC<sub>term</sub></i>	56 °C
<i>ATEG_04218</i>	59 °C
<i>ATEG_04999</i>	58 °C
<i>ATEG_02823</i>	59 °C
<i>ATEG_06111</i>	59 °C
<i>ATEG_01730</i>	59 °C
<i>AN9226</i>	55 °C
<i>ATEG_03090</i>	59 °C
<i>NFIA_043670</i>	59 °C
<i>NFIA_093690</i>	58 °C
<i>pyrG</i>	59 °C
<i>pyroA</i>	59 °C

### 3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Alle benötigten Lösungen und Puffer sind in Tab. 3-14 aufgeführt. Die Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurden je nach gewünschten Trennbereich Agarosegele mit einer Konzentration von 0,6 bis 1,2 % Agarose in 1 x TAE-Puffer verwendet. Je nach verwendeter Größe des Agarosegels wurden 60 ml oder 120 ml Gellösung angefertigt. Zum Nachweis der DNA wurden 3 µl oder 6 µl SYBR® Safe DNA Farbstoff (Tab. 3-3) hinzugegeben. Vor dem Auftragen der DNA-Proben erfolgte das Mischen mit 6 x DNA-Ladepuffer im Verhältnis 6:1. Als Laufmittel diente ebenfalls 1 x TAE-Puffer und die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 90 V (Compact-Mini Kammer MBT 20 EL) bzw. 120 V (Compact-Midi Kammer MBT 30 EL). Als Größen und Konzentrationsstandard diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Tab. 3-3). Da es sich bei SYBR® Safe um einen DNA-interkalierenden Farbstoff handelt, konnte die Detektion mittels UV-Licht erfolgen und mittels um einen UV-Filter erweiterten Fotokamera (Olympus) dokumentiert werden.

### 3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der jeweiligen Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.5), wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht anhand des Größenstandards identifiziert und mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mittels des HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit (Tab. 3-3) nach Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mit 60 – 65 °C temperiertem, autoklaviertem bidest. Wasser.

### 3.6.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt unter zur Hilfenahme des Größen- und Konzentrationsstandards GeneRuler DNA Ladder Mix (Tab. 3-3). DNA- und RNA-Proben wurden auch durch die Verwendung eines NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) analysiert. Hierbei wird das Lambert-Beer'sche Gesetz insoweit modifiziert, dass eine Korrelation zwischen der Absorption und der Konzentration besteht.

$$c = (A \times \epsilon) / b$$

**c** = Nukleinsäurekonzentration [ng/μl]

**A** = Absorption [AU]

**ε** = Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient [ng-cm/μl]

**b** = Schichtdicke [cm]

die Extinktionskoeffizienten dabei sind:

doppelsträngige DNA: 50 ng-cm/μL

einzelsträngige DNA: 33 ng-cm/μl

RNA: 40 ng-cm/μl

Demzufolge entspricht eine  $A_{260} = 1$  dabei 50 ng/μL doppelsträngiger (ds) DNA und im Falle von RNA 40 ng/μl.

Mit Hilfe dieses Verfahrens können auch Aussagen über die Qualität der Nukleinsäureaufreinigung getroffen werden, da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm aufzeigen. Je nach Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$  können Aussagen über Kontaminationen durch Proteine oder Phenol getroffen werden. Für hochreine DNA liegt dieses Verhältnis idealerweise bei 1,8 und für saubere RNA bei 2,0. Andersartige Verunreinigungen, wie Polysaccharide können wiederum das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{230}$ , welches zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollten, beeinflussen. Je niedriger die Werte der beiden Absorptionsverhältnisse sind, desto größer ist der Verunreinigungsgrad der jeweiligen aufgereinigten Nukleinsäurespezies.

### 3.6.8 Restriktionsverdau

Die Restriktionen durch Endonukleasen zur Analyse von DNA wurden standardmäßig in einem Volumen von 10 μl durchgeführt. Die Zugabe von Restriktionsenzymen und den zugehörigen Reaktionspuffern erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Präparative Restriktionsverdau zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in Volumina bis zu 100 μl durchgeführt.

### 3.6.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy wurden diese in einem molaren Verhältnis von 1:1 bei kleineren Inserts ( $\leq 2000$  bp) und bis 5:1 bei größeren Inserts ( $> 2000$  bp) eingesetzt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde entweder direkt nach der PCR eingesetzt oder zuvor durch Gelextraktion (Kapitel 3.6.6) aufgereinigt. Bei der Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T easy wurde auf die Ligase und den zugehörigen Puffer des pGEM-T Easy Vector Systems zurückgegriffen. Die Ligation erfolgte dabei über Nacht bei 4 °C. Für die Erstellung der entsprechenden Expressionskonstrukte wurden die jeweiligen DNA-Fragmente und die Zielvektoren aufgereinigt und mit der T4-DNA-Ligase (Jena Bioscience) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Ligationsansätze wurden für die Transformation von chemokompetenten *E. coli* unbehandelt weiterverwendet. Im Falle von elektrokompetenten Zellen erfolgte vorhergehend die Entsalzung des Ligationsansatzes um eine erfolgreiche Transformation gewährleisten zu können (Kapitel 3.6.9).

Tab. 3-23: Ligationsansatz für pGEM-T Easy bzw. Expressionsvektoren.

pGEM-T easy		Expressionsvektoren	
Komponente	Volumen (µl)	Komponente	Volumen (µl)
PCR-Produkt	3,5	Insert	variabel
pGEM-T Easy	0,5	Vektor	variabel
2 x Rapid Buffer	1,0	10 x T4-Ligase Puffer	1,0
T4-DNA Ligase	5,0	T4-DNA Ligase	2,0
Gesamt-Volumen	10	Gesamt-Volumen	20

### 3.6.10 CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation von *E. coli*

#### 3.6.10.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

Die Herstellung erfolgte unter sterilen Bedingungen und auf Eis. 5 ml LB-Medium wurden unter Nutzung der jeweiligen Antibiotikaresistenz des verwendeten *E. coli*-Stammes mit 10 µl *E. coli* Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden zum Animpfen einer 100 ml Hauptkultur eingesetzt

und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer  $A_{600}$  von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden bei  $3000 \times g$  und 4 °C für 10 min pelletiert und in 30 ml einer eiskalten 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Tab. 3-13) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei  $3000 \times g$  und 4 °C wurde das Zell-Pellet in weiteren 20 ml einer eiskalten 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen und weiterführend für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 3 - 5 ml einer eiskalten 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin (Tab. 3-13) vorsichtig resuspendiert. Von den Zellen wurden 200  $\mu\text{l}$  Aliquots hergestellt und bei -80 °C gelagert.

### 3.6.10.2 Herstellung ultrakompetenter Zellen

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden auch ultrakompetente Zellen vorbereitet. 5 ml SOB-Medium wurden unter Nutzung der jeweiligen Antibiotikaresistenz des verwendeten *E. coli*-Stammes mit 10  $\mu\text{l}$  *E. coli* Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 2 ml dieser Vorkultur in 250 ml frisches SOB-Antibiotikum-Medium überführt und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer  $A_{600}$  von 0,6 kultiviert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen für 10 min auf Eis. Nach der Zentrifugation der Zellen bei  $4000 \times g$  und 4 °C für 10 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 80 ml einer eiskalten TB-Lösung (Tab. 3-13) aufgenommen und erneut für 10 min auf Eis belassen. Nach erneuter Zentrifugation bei  $4000 \times g$  und 4 °C für 10 min wurde das Zellpellet unter Zugabe von 20 ml einer eiskalten TB-Lösung und 1,4 ml einer DMSO-Lösung vorsichtig resuspendiert. Von den Zellen wurden 400  $\mu\text{l}$  Aliquots hergestellt und bei -80 °C gelagert.

### 3.6.10.3 Hitzeschock-vermittelte Transformation von *E. coli*

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 200  $\mu\text{l}$  chemokompetente oder ultrakompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend 10 % des Ligationsansatz hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Nach derselben Zeit auf Eis wurden zur Regeneration der Zellen 600  $\mu\text{l}$  SOC-Medium (Kapitel 3.3.1.1) ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellen unter Schütteln bei 180 rpm 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei  $4000 \times g$  für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen im Rückfluss resuspendiert. Die Zellen wurden auf einer selektiven LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.6.11 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

#### 3.6.11.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Analog zur Herstellung anderer Arten von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde eine Hauptkultur (100 ml) unter selektiven Bedingungen bis zu einer  $A_{600}$  von 0,6 kultiviert (37 °C, 220 rpm), dann das Medium durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 x *g* und 4 °C abgetrennt und die Zellen mit 50 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerin-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nach Abtrennung des Überstandes wurden die Zellen in 2 - 5 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerin-Lösung aufgenommen und 50 µl Aliquots bis zur Transformation bei -80 °C aufbewahrt.

#### 3.6.11.2 Elektroporation

Nach Zugabe von ca. 1 µg DNA zu 50 µl elektrokompenter *E. coli* Zellen wurde die Mischung in eine eiskalte Elektroporationsküvette (Ø 2 mm) überführt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach dem elektrischen Puls wurde 600 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C und 180 rpm für 1 bis 2 h regeneriert. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 4000 x *g* und 4 °C für 5 min erfolgte die Selektion auf einer LB-Agar Platte mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C über Nacht.

### 3.6.12 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient der Kontrolle von Ligationsansätzen mit dem Klonierungsvektor pGEM-T easy. Es erlaubt eine erleichterte Identifizierung positiver Klone. Hierbei finden *E. coli*-Stämme ihre Anwendung, welche aufgrund einer Mutation nicht in der Lage sind eine funktionelle β-Galactosidase zu synthetisieren (z.B. DH5α, XL1-Blue MRF'). Erst eine Komplementation durch das auf einem Vektor codierten α-Peptid ermöglicht die Bildung einer aktiven β-Galactosidase. Durch die Zugabe von IPTG erfolgt die Induktion der Expression des *lacZ*-Gens im pGEM-T Easy Vektor. Der zugegebene Indikator X-Gal wird von der β-Galaktosidase hydrolisiert, was durch die Bildung von 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo zur

Blaufärbung der Bakterienkolonie führt. Da sich die intakte MCS (Multi Cloning Site) im *lacZ*-Gen befindet, hat die Insertion eines DNA-Fragmentes eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge und unterbindet somit die Biosynthese des benötigten  $\alpha$ -Peptids. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Entstehung eines ungeeigneten vergrößerten  $\alpha$ -Peptides. Beide Fälle führen wiederum zur Weißfärbung von *E. coli* Einzelkolonien, welche anschließend zur Plasmidisolierung von der LB-Agar Platte in selektives LB-Medium überführt werden. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden 6,7  $\mu$ l einer sterilen IPTG-Lösung (1 M), 40  $\mu$ l einer X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) und 153,3  $\mu$ l bidest. Wasser vermischt und auf einer plasmidselektiven LB-Agar-Platte ausplattiert. Zur Eliminierung des für *E. coli* toxischen Lösungsmittel DMF, wurde die Platte 30-60 min unter der Sterilbank ausgedampft. Pro Agar-Platte wurde anschließend ein *E. coli* -Transformationsansatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.6.13 Transformation von *A. nidulans* TN02A7 durch Protoplastierung

Sämtliche folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Je nach Sporulationsgrad wurden 5 - 10 Kulturplatten des Pilzes *A. nidulans* TN02A7 zur Sporengewinnung verwendet (Kapitel 3.5.3). Die erhaltenen Sporen wurden in 1 ml GMM-Flüssigmedium mit Zusätzen resuspendiert und in einen sterilen 1 L Erlmeyerkolben mit 400 ml selektivem GMM-Medium bei 30 °C und 130 rpm für ca. 12 bis 13 h kultiviert und anschließend die Keimung der Sporen mikroskopisch kontrolliert. Bei Keimschläuchen, die etwa 2 - 3 mal so lang wie der Durchmesser der Konidien waren, wurde die Zellkultur bei 3000 rpm und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet durch 2maliges Waschen mit 50 ml sterilem Aqua dest. von Medienresten befreit. Die ausgekeimten Konidien wurden in 10 ml Osmotischem Medium aufgenommen. Nach der Zugabe von Lysing Enzymes (ca. 100 mg pro 1 g ausgekeimte Konidien) einem Gemisch aus Chitinasen,  $\beta$ -Glucanasen und Proteasen aus *Trichoderma harzianum* zum Zellwandaufschluss wurde die gesamte Suspension in einen sterilen 1 L Erlmeyerkolben gegeben und bei 30 °C und 80 rpm für ca. 3 - 4 Stunden inkubiert. Nach zwischenzeitlicher mikroskopischer Kontrolle wurde die Protoplastensuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 4 ml Trapping-Puffer überschichtet (Tab. 3-18). Nach Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C für 15 Minuten sammelten sich die Protoplasten in einer trüben Zwischenschicht und wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin erfolgten die Zugabe des 2-fachen Volumens an



STC-Puffer und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die pelletierten Protoplasten wurde schonend in 1 ml STC-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei  $14000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 20 Sekunden wurden die Protoplasten in  $150\text{ }\mu\text{l}$  STC-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Die zur Transformation benötigte Plasmid-DNA (ca.  $3\text{ }\mu\text{g}$ ) wurde mit  $70 - 80\text{ }\mu\text{l}$  STC-Puffer verdünnt und mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  Protoplasten-Suspension vorsichtig gemischt. Nach weiterer Inkubation für 50 Minuten auf Eis wurden  $1,25\text{ ml}$   $\text{CaCl}_2$ -PEG-Lösung (Tab. 3-18) hinzugegeben und nach umsichtigen Invertieren für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Verdünnung des Ansatzes erfolgten die Zugabe von  $5\text{ ml}$  STC-Puffer und die Lagerung auf Eis bis zur weiteren Verwendung. Für jede Bottom-Medium-Kulturplatten mit den entsprechenden Zusätzen wurden  $600\text{ }\mu\text{l}$  Transformationsansatz ausplattiert und umgehend mit  $5\text{ ml}$   $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmem, selektivem Top- Agar überschichtet. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wurde anstelle von STC-Puffer Wasser zur Protoplasten-Suspension hinzugefügt, welches das Platzen der Protoplasten zur Folge hat. Ein weiterer Transformationsansatz wurde auf Medium ohne Selektionsmarker verteilt. Die Regeneration der Protoplasten fand bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 3 bis 6 Tage statt. Zur Bestimmung des Titors der keimungsfähigen Protoplasten erfolgte die Anfertigung einer Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$ . Dazu wurden jeweils  $10\text{ }\mu\text{l}$  Protoplasten-Suspension mit  $90\text{ }\mu\text{l}$  STC-Puffer verdünnt, auf Bottom-Medium mit Zusätzen ausplattiert und in Top-Agar eingebettet, welche auch das Wachstum des untransformierten Stammes ermöglichen würden.

### 3.7 Methoden der Biochemie

#### 3.7.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Eine  $100\text{ ml}$  LB-Vorkultur wurde mit dem benötigten Antibiotikum versetzt und mit  $10\text{ }\mu\text{l}$  einer Glycerin-Dauerkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $220\text{ rpm}$  über Nacht. Daraufhin wurden  $100\text{ ml}$  bzw.  $1000\text{ ml}$  frisches selektives Medium mit  $2\text{ ml}$  bzw.  $20\text{ ml}$  der Vorkultur angeimpft und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $220\text{ rpm}$  kultiviert. Nach Erreichen einer  $A_{600}$  von  $0,6$  erfolgte die Induktion der Genexpression mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG bei  $30$  oder  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , für  $6$  oder  $16$  Stunden (exemplarisch Tab. 3-24). Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation ( $4000 \times g$ ,  $8\text{ min}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugiert und in  $7\text{ ml}$  Lysepuffer aufgenommen oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Nach Zugabe von

Lysozym (1 mg/ml) wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der mechanische Aufschluss der *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall mit 6 Zyklen für je 10 s bei 200 bis 300 W (Branson Sonifier 250) bei 4 °C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 20000 x *g* und 4 °C wurde der Überstand (lösliche Proteinanteile) von den pelletierten, unlöslichen Bestandteilen abgenommen und das überproduzierte Protein anschließend mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 3.7.2) aus dem Lysat aufgereinigt.

Tab. 3-24 Expressionsbedingungen für EAU34068 und EAU36020

exprimiertes Protein	Kultivierungsbedingungen
EAU34068	37 °C; 0,5 mM IPTG; 16 h
EAU36020 (CdpC7PT)	37 °C; 0,3 mM IPTG; 16 h

### 3.7.2 Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose

Das Lysat der *E. coli*-Zellen wurde mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) versetzt und bei 4 °C für 1 h unter Rühren vermischt. Für das Lysat aus 100 ml Zellkultur wurden 50 µl Ni-NTA-Agarose und für das Lysat aus 1000 ml Zellkultur 500 µl verwendet. Anschließend wurde die Suspension auf eine Leersäule mit Fritte überführt und nach dem Durchlauf die Säule zweimal mit 4 bzw. 8 ml Waschpuffer (Kapitel 3.3.3.4) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 500 µl bzw. 2,5 ml Elutionspuffer. Zum Entsalzen wurde die Elutionsfraktion auf eine mit Proteinlagerungspuffer äquilibrierte NAP5- oder PD10-Säule gegeben und mit insgesamt 1 ml bzw. 3,5 ml Proteinlagerungspuffer eluiert. Die aufgereinigte Proteinfraction wurde abschließend aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Im Verlauf der Aufreinigung wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben gezogen und diese mittels *Sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Kapitel 3.7.3) analysiert.

### 3.7.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel nach der Methode von (Laemmli 1970) angewendet. Dabei besitzen Sammel- und Trenngel unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte und erfüllen somit unterschiedliche Funktionen. Das Sammelgel sorgt für eine Konzentrierung der Proteine, während die

eigentliche Trennung im namensgebenden Trenngel erfolgt. Bei der verwendeten Elektrophorese-Zelle handelte es sich um die Mini-PROTEAN® 3 der Firma Bio-Rad (München). Die notwendigen Puffer und Lösungen sind in Tab. 3-16 (Kapitel 3.3.3.5) aufgeführt. Das 12 %ige Trenngel wurde mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet. Die Zusammensetzung der einzelnen Gele ist in Tab. 3-16 (Kapitel 3.3.3.5) dargestellt. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit 5 × Protein-Probenpuffer gemischt. Als Größenstandard wurde der Low molecular weight SDS marker (GE Healthcare) verwendet und entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Zur Probenvorbereitung wurden der Proteingrößenstandard und die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 60 min bei einer kontinuierlichen Spannung von 180 V. Der Verlauf wurde anhand der Migration des Bromphenolblau verfolgt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Das SDS-Gel wurde bis zum gewünschten Entfärbungsgrad für 1 bis 2 Stunden in der Entfärbelösung (Kapitel 3.3.3.5) inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen.

### **3.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford gewählt (Bradford 1976). Die Erfassung der Proteinkonzentration erfolgt dabei anhand einer Kalibrierungsgeraden von 1 bis 10 µg Bovinem Serumalbumins (BSA). Sämtliche Proben, auch die zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden wurden mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml 1 × Bradford-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption mit einem UV-Spektrometer bei 595 nm detektiert. Für jede Verdünnung zur Bestimmung der Kalibrierungsgeraden wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, aus deren Mittelwerten dann die Kalibrierungsgerade erstellt wurde.

### **3.7.5 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels NanoDrop**

Die Ermittlung der Proteinkonzentration, insbesondere bei Aufreinigungen zur Durchführung von Isolationsassays, wurde weiterführend auch mit Hilfe des NanoDrop 2000c durchgeführt. Hierbei erfolgt die Quantifizierung bei der Wellenlänge 280 nm, da hier in Proteinen überwiegend die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und vorallem Tryptophan

absorbieren. Da auch hier die Konzentrationsbestimmung anhand des Lambert-Beer'schen-Gesetzes erfolgte, wurden zum Erhalt proteinspezifischer Werte, sowohl der proteinspezifische molare Extinktionskoeffizient, als auch das Molekulargewicht verwendet.

### **3.7.6 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)**

Zur Bestimmung der nativen Molekulargewichte überproduzierter, aufgereinigter Proteine wurde eine Größenausschlusschromatographie mit der ÄKTaprime™ plus Anlage der Firma GE Healthcare (Freiburg) durchgeführt. Zur Trennung wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule eingesetzt, welche zuvor mit FPLC-Puffer (Kapitel 3.3.3.6, Tab. 3-17) equilibriert wurde. Die Messungen wurden stets bei einer Temperatur von 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Darstellung der Absorption bei 280 nm erfolgte halblogarithmisch mit dem Rekorder LKB Bromma 2210 (2-Channel Recorder). Die verwendeten Fließmittel wurden vor der Verwendung sowohl filtriert (Porengröße 0,2 µm), als auch entgast. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa).

### **3.7.7 Enzymatische Reaktionsansätze**

#### **3.7.7.1 CdpC7PT-Aktivitätsassays**

Ein Standardansatz von 100 µl enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM des jeweiligen Substrats (zyklische Dipeptide), 2 mM DMAPP und 50 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub>. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Die Ansätze wurden mit 0,6 Vol. Methanol abgestoppt, 20 min bei 17000 × g und 4 °C zentrifugiert und mittels HPLC analysiert. Als Standard diente ein Gemisch aus 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM des jeweils eingesetzten Substrates und als Kontrolle fungierten Ansätze mit denaturiertem CdpC7PT-His<sub>6</sub>. Hierfür wurde das Protein für 30 min bei 100 °C erhitzt. Zur Bestimmung der Ionenabhängigkeit wurden jeweils 5 mM des entsprechenden Metallions bzw. EDTA hinzugefügt und die Ansätze mit (S)-Benzodiazepindion und 20 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> für 16 h bei 37 °C inkubiert. Für die Zeitabhängigkeit wurde der Standardansatz mit 20 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> angesetzt und für 0, 15, 30, 60, 120, 240, 360 und 960 min bei 37 °C inkubiert. Zur Spezifizierung der Proteinabhängigkeit erfolgte der Einsatz von 1, 2, 5, 10, 20 und 50 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> für einen

Inkubationszeitraum von 60 min bei 37 °C. Für die Abhängigkeit vom Prenyldonor DMAPP wurden 1 mM (S)-Benzodiazepindion, 10 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und DMAPP in den Endkonzentrationen von 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 mM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte hierbei für 60 min bei 37 °C. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter, wie Michaelis-Menten Konstanten ( $K_M$ -Wert), maximale Umsatzgeschwindigkeiten ( $v_{\max}$ ) und katalytische Effizienzen ( $k_{\text{cat}}$ ) enthielten die Ansätze 10 oder 20 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM DMAPP und jeweils 0,010, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, und 5 mM des jeweiligen Substrates. Im Fall von (S)-Benzodiazepindion und *cyclo*-L-Trp-L-Trp wurden für die Bestimmung 10 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> und bei *cyclo*-L-Trp-L-Tyr, *cyclo*-L-Trp-L-Leu, *cyclo*-L-Trp-L-Ala, *cyclo*-L-Trp-L-Phe und *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr jeweils 20 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> verwendet.

### 3.7.7.2 EAU34068-His<sub>6</sub>-Aktivitätsassays

Der Standardansatz (100 µl) enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM DMAPP oder GPP wurden mit 40 µg EAU34068-His<sub>6</sub> durchgeführt. Als Substrate wurden 1 mM diverser zyklischer Dipeptide, Hydroxynaphthaline, und Flavonoide eingesetzt. Im Falle von Xanthonen wurden aufgrund von Löslichkeitsproblemen lediglich 0,5 mM Substrat eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Das Abstoppen der Reaktionsansätze erfolgte durch die Lagerung auf Eis und die Zugabe von 0,6 Vol. Methanol. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 17000 × g und 4 °C erfolgte die Analyse mittels HPLC. Als Standard diente ein Gemisch aus 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 0,5 oder 1 mM des jeweils eingesetzten Substrates, sowie die Reaktionsansätze mit hitzeinaktiviertem EAU34068-His<sub>6</sub>. Dazu wurde das Protein für 30 min bei 100 °C denaturiert. Für die Ermittlung der Zeitabhängigkeit wurde der Standardansatz mit 20 µg EAU34068-His<sub>6</sub> angesetzt und für 0, 15, 30, 60, 120 und 960 min bei 37 °C inkubiert. Für die Abhängigkeit der Proteinmenge wurden 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 µg EAU34068-His<sub>6</sub> verwendet und die Ansätze für 60 min inkubiert. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter, wie Michaelis-Menten Konstanten ( $K_M$ -Wert), maximale Umsatzgeschwindigkeiten ( $v_{\max}$ ) und die katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) enthielten die Ansätze 10 oder 20 µg EAU34068-His<sub>6</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM GPP und jeweils 0,010, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, und 5 mM des Substrates. Bei Eriodictyol wurden 10 µg EAU34068-His<sub>6</sub> und bei 1-Naphthol, 1,7-Dihydroxynaphthalin, sowie 1,3,6-Trihydroxyxanthon jeweils 20 µg EAU34068-His<sub>6</sub> eingesetzt.

### 3.7.7.3 Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte von CdpC7PT

Bei der Isolierung der enzymatischen Produkte von CdpC7PT erfolgte der Ansatz des Enzymassay im 20 ml Maßstab mit 4 - 5 mg CdpC7PT-His<sub>6</sub>, 1 mM Substrat, 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereint und bis zur Trockene mittels Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 400 µl Methanol und die Isolierung der enthaltenen Produkte mittels HPLC.

### 3.7.7.4 Reaktionsansätze zur Isolierung der enzymatischen Produkte mit EAU34068-His<sub>6</sub>

Zur Isolierung der enzymatischen Produkte von EAU34068-His<sub>6</sub> zur Strukturaufklärung wurde jeweils ein 20 ml Ansatz mit 4 mg EAU34068-His<sub>6</sub>, 1 mM Substrat, 1 mM GPP, 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 400 µl Methanol aufgenommen und die enthaltenen Produkte mittels HPLC isoliert.

## 3.8 Isolierung von Sekundärstoffen aus Ascomyceten

### 3.8.1 Extraktion der Kulturüberstände von *A. nidulans* TN02A7 und Transformanten

Der *A. nidulans* Stamm TN02A7 und dessen Transformanten wurden zur Analyse von Sekundärmetaboliten in unterschiedlichen Medien (100 ml) bei 37 °C und unter Schütteln bei 130 rpm für 5 Tage im Dunkeln kultiviert (Kapitel 3.3.1.2). Vor der Extraktion der Kulturüberstände wurde das Mycel über Glaswolle abgetrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert (Kapitel 3.8.2). Die Kulturüberstände wurden daraufhin zweimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt, die Ethylacetatphasen vereinigt und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 1000 µl Methanol aufgenommen und mittels HPLC (Kapitel 3.9.1) analysiert.

### 3.8.2 Extraktion des Mycel von *A. nidulans* TN02A7 und Transformanten

Das Mycel wurde mit 2 Vol. eines Methanol/Aceton-Gemisches (1:1) versetzt, 1 Stunde unter Schütteln inkubiert und anschließend über Glaswolle abgetrennt. Daraufhin erfolgte die Einengung des Lösungsmittelgemisch bis zur Trockene. Der Rückstand wurde in 1000 µl Methanol aufgenommen und mittels HPLC (Kapitel 3.9.1) analysiert.

## 3.9 Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen

### 3.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### 3.9.1.1 Geräte und Säulen

Bei den verwendeten HPLC-Anlagen handelte es sich um die 1200 Serie der Firma Agilent (Böblingen). Für analytische Fragestellungen kam als Hauptsäule eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) bei einer Flussrate von 1 ml/min in Kombination mit einer protektiven, Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) zur Anwendung. Zur präparativen Isolierung erfolgte die Trennung über eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) in Kombination mit einer Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Langerwehe) bei einer Flussrate von 2,5 ml/min. Die Detektion erfolgte jeweils mit einem Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 bzw. 277 nm. Die zur Trennung verwendeten Fließmittelkomponenten wurden in einem Gradientensystem verwendet und sind in Tab. 3-25 zusammengefasst.

Tab. 3-25: Fließmittel zur Trennung niedermolekularer Substanzen mittels HPLC.

Lösungsmittel	Fließmittel-Bestandteile
A	bidest. Wasser
B	bidest. Wasser + 0,5 % TFA
C	Methanol
D	Methanol + 0,5 % TFA
E	Acetonitril
F	Acetonitril+ 0,5 % TFA

### 3.9.1.2 Analytik der verschiedenen Reaktionsansätze

Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden mit einem Gradienten über einen bestimmten Zeitraum analysiert. Im Anschluß erfolgte ein 5-minütigen Waschschrift mit 100 % Methanol und weitere 5 min Äquilibration auf das Anfangsverhältnis. Als Fließmittel dienten bidest. Wasser (Lösungsmittel A) und Methanol (Lösungsmittel C). Für die Analyse der enzymatischen Produkte von CdpC7PT-His<sub>6</sub> und EAU34068-His<sub>6</sub> wurde ein linearer Gradient von 30 % auf 100 % Lösungsmittel C in 20 min bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet.

### 3.9.1.3 Isolierung der enzymatischen Produkte der verschiedenen Reaktionen

Die Isolierung der enzymatischen Produkte von CdpC7PT-His<sub>6</sub> und EAU34068-His<sub>6</sub> erfolgte auf einer präparativen Säule (Kapitel 3.9.1.1) mit einem linearen Gradienten von 50 % auf 100 % in 20 min bei einer Flussrate von 2,5 ml/min. Die Produktpeaks wurden gesammelt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

### 3.9.1.4 Analytik der Extrakte von *A. nidulans* TN02A7 und Transformanten

Für die Analyse der Extrakte von *A. nidulans* TN02A7 und dessen Transformanten wurde vorwiegend ein linearer Gradient von 10 % auf 100 % Lösungsmittel D (Methanol + 0,5 % TFA) in 40 min in Lösungsmittel B (bidest. Wasser + 0,5 % TFA) verwendet. Im weiteren Verlauf der Arbeiten insbesondere für die Transformanten von *A. nidulans* TN02A7 mit *NFIA\_093690* (*ftmPS*) und im Weiteren mit *cdpNPT* auch Lösungsmittel E (Acetonitril) in Kombination mit Lösungsmittel A (bidest. Wasser). Für die verwendete Multospher RP-18-Säule wurde eine Flussrate von 1 ml/min genutzt.

### 3.9.1.5 Isolierung aus den Transformanten von *A. nidulans* TN02A7

Die Isolierung der Extrakte von *A. nidulans* TN02A7 erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10 % auf 100 % Lösungsmittel E (Acetonitril) in Lösungsmittel A (bidest. Wasser) in 40 min. Eine Flussrate von 2,5 ml/min wurde verwendet. Die Produktpeaks wurden gesammelt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.



### 3.9.2 Massenspektrometrie (MS)

Die Messungen der hochauflösenden Elektronenstoß-Ionisation-Spektren (HR-EI-Spektren) der enzymatischen Produkte von CdpC7PT (Kapitel 7.2) erfolgten durch Dr. Laufenberg und Frau Zitzer an einem AutoSpec-Gerät der Firma Micromass Co. UK Ltd (jetzt Bruker). Die Messungen der hochauflösenden Elektrospray-Ionisation-Spektren (HR-ESI-Spektren) der Kulturfiltratextrakte von *A. terreus* DSM 1958 wurden mittels eines LTQ-FT Ultra ESI-MS Instrumentes (Thermo Fischer Scientific) durchgeführt.

#### 3.9.2.1 Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (LC/MS)

Kulturextrakte von Ascomyceten wurden Methanol gelöst und an einem 1100 HPLC System (Agilent Technologies) aufgetrennt, das mit einem LTQ-FT Ultra Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific) verbunden war. Dieses wiederum bestand aus einer linearen Ionenfalle (MS), sowie einer FT-ICR-Zelle (HR-MS). Als Fließmittel wurden Lösungsmittel A und Lösungsmittel E bei einer Flussrate von 0,2 ml/min verwendet. Die Auftrennung erfolgte nach Beschreibung in Kapitel 3.9.1.4. Die Messungen wurden von Herrn Dr. Uwe Linne betreut.

### 3.9.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Probenvorbereitung für die Strukturaufklärung durch NMR-spektroskopische Analysen erfolgte das Trocknen der Proben über Nacht im Gefriertrockner. Daraufhin wurden die Proben in deuteriertem Lösungsmittel (Eurisotop) aufgenommen. Das Lösungsmittelsignal diente zur Kalibrierung der chemischen Verschiebungen. Die Auswertung der NMR-Daten erfolgte mit der Software MestReNova v5.2.2 (MestreLab Research, S.L., Santiago de Compostela). Die NMR-Messungen durch Herrn Dr. Kämpchen und Herrn Newel erfolgten an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, München). Die zu analysierenden Proben wurden in CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD oder DMSO-d<sub>6</sub> aufgenommen. Die Lösungsmittelsignale dienten dabei der Kalibrierung der chemischen Verschiebungen und sind in Tab. 3-26 aufgelistet.

**Tab. 3-26: Lösungsmittelsignale (Fulmer *et al.*, 2010), die der Kalibrierung der chemischen Verschiebungen dienen.**

Lösungsmittel	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
CDCl <sub>3</sub>	7,26	-
DMSO-d <sub>6</sub>	2,50	-
CD <sub>3</sub> OD	3,31	49,00

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus Ascomyceten

#### 4.1.1 Einleitung

In den letzten Jahren konnten durch vergleichende Genomsequenz-Analysen verschiedener Ascomyceten, insbesondere der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, eine Vielzahl putativer Prenyltransferasegene identifiziert werden. Speziell im Falle von *A. terreus* konnten zehn vermeintliche Prenyltransferasegene der DMATS-Superfamilie ermittelt werden (Khaldi *et al.*, 2010). Hiervon sind bereits fünf Gene oder deren Orthologe molekularbiologisch durch Deletionsexperimente, beziehungsweise biochemisch über rekombinante Proteine charakterisiert worden. Hierbei handelt es sich zum einen um *ATEG\_10306*, welches zum Acetylaszonalenin-Gencluster gehört und durch dessen Ortholog in *N. fischeri* NRRL 181 die Prenyltransferase AnaPT kodiert wird. AnaPT ist dabei für die C3 $\alpha$ -Prenylierungsreaktion an (R)-Benzodiazepindion verantwortlich (Yin *et al.*, 2009b). Weiterführend auch um *ATEG\_08428*, dessen Ortholog *Afu3g12930* aus *A. fumigatus* Af293 für 7-DMATS kodiert (Kremer *et al.*, 2007) und eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Astechrom spielt, sowie um *ATEG\_09980*, welches für AstPT kodiert und somit sowohl für eine reverse N1-, als auch für die reguläre C2-Prenylierung von methylierten Asterriquinonen verantwortlich ist (Tarcz *et al.*, 2014a). Gendeletionstudien die benachbarten NRPS-like Gene von *ATEG\_02823* und *ATEG\_00702* betreffend, legen zudem die Vermutung nahe, dass diese beiden putativen Prenyltransferasen an der Biosynthese von Butyrolactonen und Asterriquinon CT5 beteiligt sind (Guo *et al.*, 2013). Dennoch verblieben noch fünf weitere putative Prenyltransferasegene, deren Funktionen noch ungeklärt waren: *ATEG\_04218*, *ATEG\_04999*, *ATEG\_06111*, *ATEG\_01730* und *ATEG\_03092*. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die entsprechenden Gene heterolog in *E. coli* exprimiert, die resultierenden, rekombinanten Proteine aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden.

## 4.1.2 Charakterisierung der Prenyltransferase CdpC7PT

### 4.1.2.1 Sequenzanalysen von *cdpC7PT*/CdpC7PT

Das putative Prenyltransferasegen *ATEG\_04218* (fortlaufende Bezeichnung *cdpC7PT*) ist auf dem Supercontig 5 in der Genomsequenz von *A. terreus* NIH 2624 lokalisiert (Genbank: Accession Nr. NT\_165928.1). Es setzt sich dabei aus zwei Exons mit einer Länge von 1208 bp und 133 bp zusammen, welche durch ein Intron mit einer Länge von 47 bp unterbrochen werden. Durch Alignments der Aminosäure-Sequenzen von bereits charakterisierten Prenyltransferasen (Anhang 7.1.1) und unter der Nutzung des Programmes FGENESH, konnte die enthaltene Intronsequenz abgeleitet werden. Das abgeleitete Genprodukt EAU36020 (CdpC7PT) umfasst 446 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 51,0 kDa. CdpC7PT zeigt laut Blast-Analysen deutliche Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene zu anderen Prenyltransferasen auf. Im Falle von CdpC2PT aus *N. fischeri* (Mundt & Li 2013) sind es 34 %, zu BrePT aus *A. versicolor* (Yin *et al.*, 2013a) 32 % und bei CTrpPT aus *A. oryzae* (Zou *et al.*, 2010) 29 %.

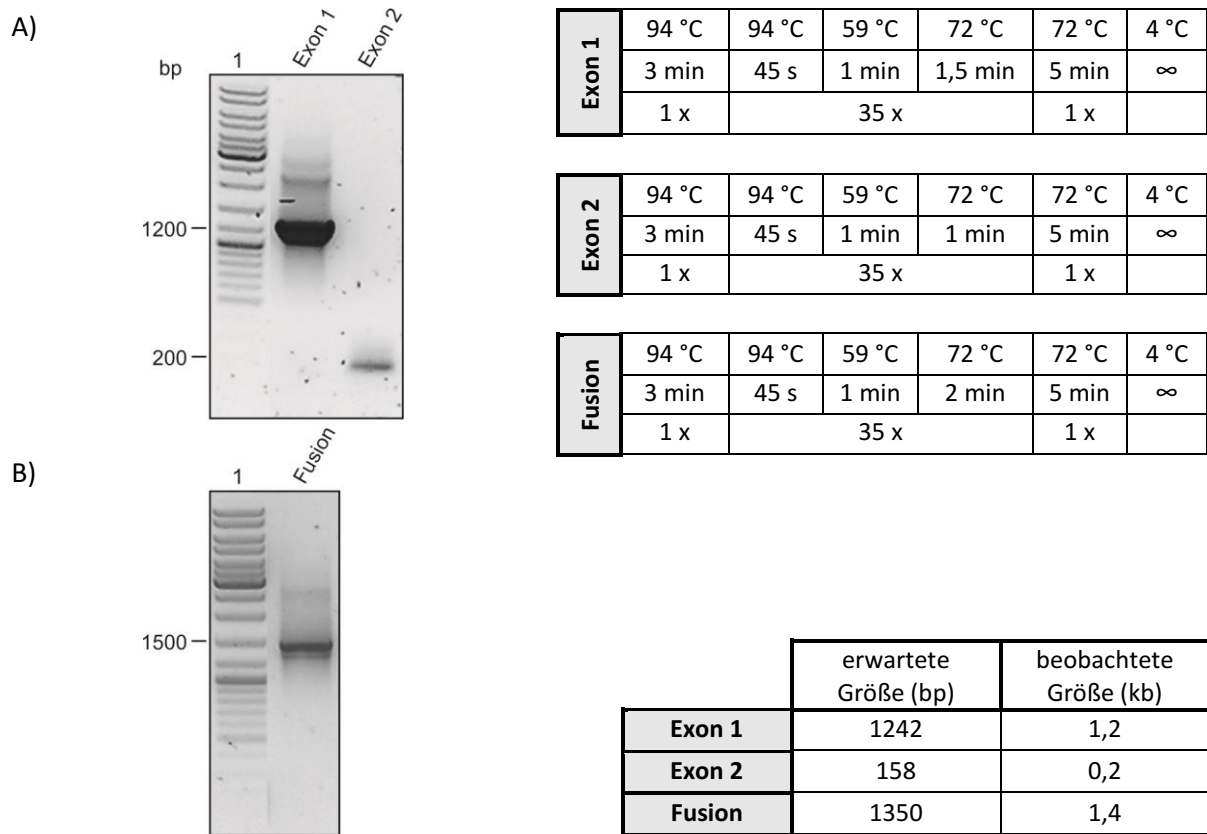
**Tab. 4-1: genetischer Kontext von *ATEG\_04218* (*cdpC7PT*) auf dem Supercontig 5 (NT\_165928.1)**

Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>ATEG_04213</i>	EAU36015	517	1875285-1876947	Cytochrome P450 Enzym
<i>ATEG_04214</i>	EAU36016	360	1878094-1879236	CoreA-ähnlicher Mg <sup>2+</sup> Transporter
<i>ATEG_04215</i>	EAU36017	261	1880434-1881434	TGF beta-induzierbares Kernprotein 1
<i>ATEG_04216</i>	EAU36018	149	1881774-1882573	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_04217</i>	EAU36019	104	1883874-1884281	β-Galaktosidase
<i>ATEG_10538</i>	-	-	1885403-1885509	tRNA
<i>ATEG_10539</i>	-	-	1885783-1885888	tRNA
<i>ATEG_10541</i>	-	-	1886334-1886439	tRNA
<b><i>ATEG_04218</i></b>	<b>CdpC7PT</b>	<b>446</b>	<b>1888259-1889646</b>	<b>Cyclische C7-Prenyltransferase (CdpC7PT)</b>
<i>ATEG_04219</i>	EAU36021	403	1890065-1891377	Aminotransferase
<i>ATEG_04220</i>	EAU36022	382	1892183-1893385	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_04221</i>	EAU36023	488	1894194-1895855	Transkriptionsfaktor
<i>ATEG_04222</i>	EAU36024	440	1896754-1897193	AMP-bindendes Enzym
<i>ATEG_04223</i>	EAU36025	265	1897754-1898551	Trans-Aconitate 2-Methyltransferase

Die Analyse der unmittelbar benachbarten Gene zeigte zwar das Vorhandensein von Modifikationsenzymen, wie ein Cytochrome P450-Enzym und eine Aminotransferase, jedoch keine Gene, die für die Biosynthese eines Sekundärmetabolit-Grundgerüsts essentiell sind, wie NRPS oder PKS. (Tab. 4-1). Somit konnten im Umfeld keine Rückschlüsse auf ein Substrat oder einen konkreten Biosyntheseweg gezogen werden.

#### 4.1.2.2 Amplifikation von *cdpC7PT* aus genomischer DNA von *A. terreus* DSM 1958

Da kein Amplifikat für *cdpC7PT* aus cDNA gewonnen werden konnte, wurde es mittels Fusions-PCR amplifiziert (Kapitel 3.6.4), wobei in einer ersten PCR-Runde beide Exons separat amplifiziert und anschließend in einer weiteren PCR-Runde fusioniert wurden. Hierbei wurde auf ein Polymerase-Gemisch mit *proofreading* Funktion zurückgegriffen um die Fehlerrate bedingt durch die Polymerase möglichst gering zu halten. Die Amplifikation des 1. Exons erfolgte durch die Primerkombination CaW\_04218-1/ CaW\_04218-3 (Abb. 4-1; A: Exon 1) und für das 2. Exon wurden die Primer CaW\_04218-2/ CaW\_04218-4 (Abb. 4-1; A: Exon 2) verwendet (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6). Der Primer CaW\_04218-4 vermittelt hierbei gleichzeitig eine Mutation im Stopcodon von *ATEG\_04218* um den Leserahmen zu verlängern und das Genprodukt zur Aufreinigung um einen Histidin-*tag* zu erweitern. Für die Fusion beider Exons wurde jeweils das PCR-Produkt 1 und das PCR-Produkt 2 als Matrize mit den flankierenden Primern CaW\_04218-1 und CaW\_04218-4 verwendet (Abb. 4-1; B: Fusion).

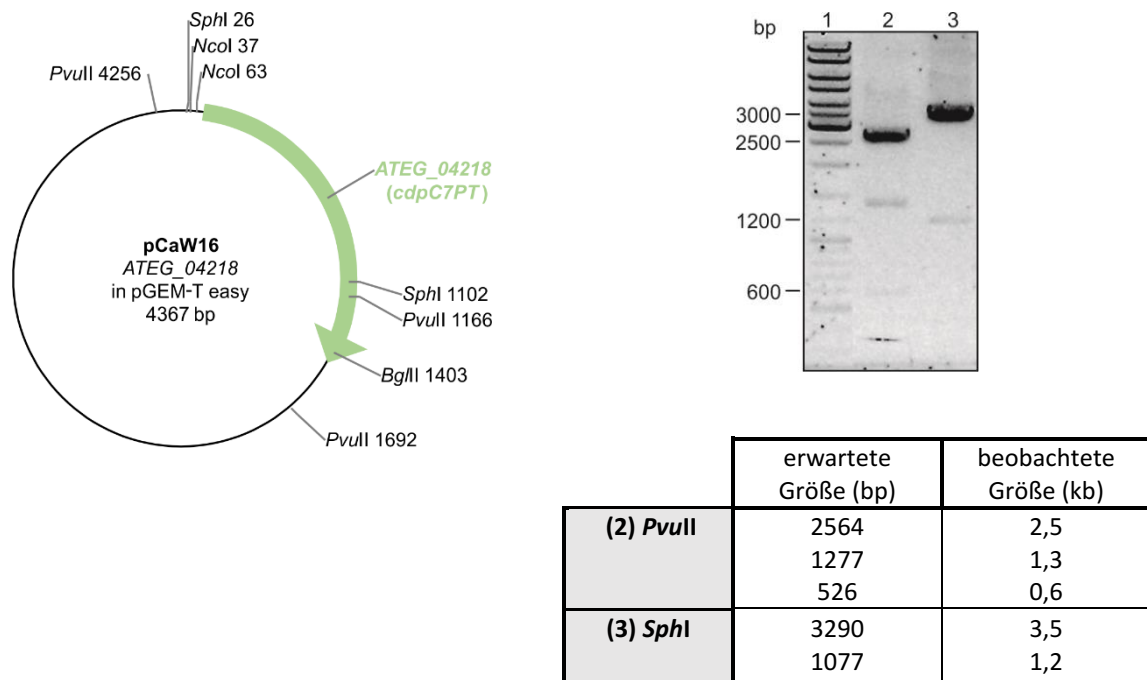


**Abb. 4-1:** Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *cdpC7PT* aus genomischer DNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2; Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

#### 4.1.2.3 Klonierung und Transformation

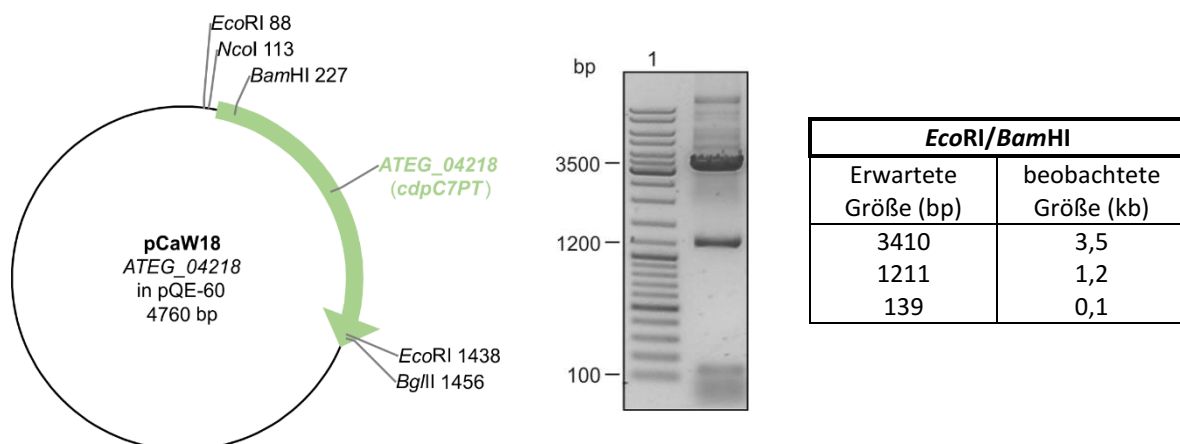
Das erhaltene PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert und durch Hitzeschock in *E. coli* DH5α eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde sowohl mit Hilfe eines *Pvu*II-, als auch eines *Sph*I-Verdau auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-2; Laufspur 2 - 3). Durch eine Sequenzierung des Klonierungskonstrukts konnte die Basensequenz von *cdpC7PT* hinsichtlich der vorhergesagten Intronsequenz und der gewünschten Mutation des Stopcodons im Konstrukt pCaW16 bestätigt werden. Auf Aminosäureebene ergaben sich einige wenige Veränderungen, I<sub>132</sub> zu V<sub>132</sub>, P<sub>158</sub> zu S<sub>158</sub>, L<sub>173</sub> zu F<sub>158</sub>, E<sub>182</sub> zu D<sub>182</sub>, T<sub>184</sub> zu A<sub>184</sub>, L<sub>185</sub> zu Q<sub>185</sub>, L<sub>195</sub> zu F<sub>195</sub>, Q<sub>220</sub> zu R<sub>220</sub>, M<sub>284</sub> zu I<sub>284</sub>, A<sub>287</sub> zu V<sub>287</sub>, D<sub>308</sub> zu N<sub>308</sub>, K<sub>309</sub> zu T<sub>309</sub>, L<sub>325</sub> zu F<sub>325</sub>, I<sub>326</sub> zu L<sub>326</sub>, Q<sub>329</sub> zu R<sub>329</sub>. Da diese Mutationen bei 2 verschiedenen Transformanten auftraten, die ihrerseits auf unterschiedliche PCR- und

Klonierungsdurchgänge zurückzuführen waren, weisen sie auf Sequenzunterschiede des verwendeten Stammes *A. terreus* DSM 1958 zum annotierten Stamm *A. terreus* NIH 2624 hin.



**Abb. 4-2:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW16 (*cdpC7PT* in pGEM-T Easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

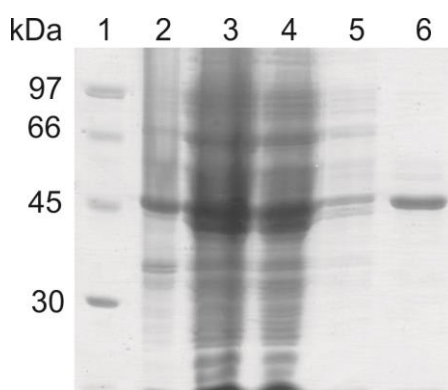
Das Plasmid pCaW16 wurde mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bgl*II geschnitten und das 1340 bp DNA-Fragment in den Expressionsvektor pQE-60 überführt, der zuvor analog mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffnet wurde. Das erhaltene Expressionskonstrukt pCaW18 wurde mittels *Eco*RI/*Bam*HI-Verdau analysiert (Abb. 4-3).



**Abb. 4-3:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW18 (*cdpC7PT* in pQE-60) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

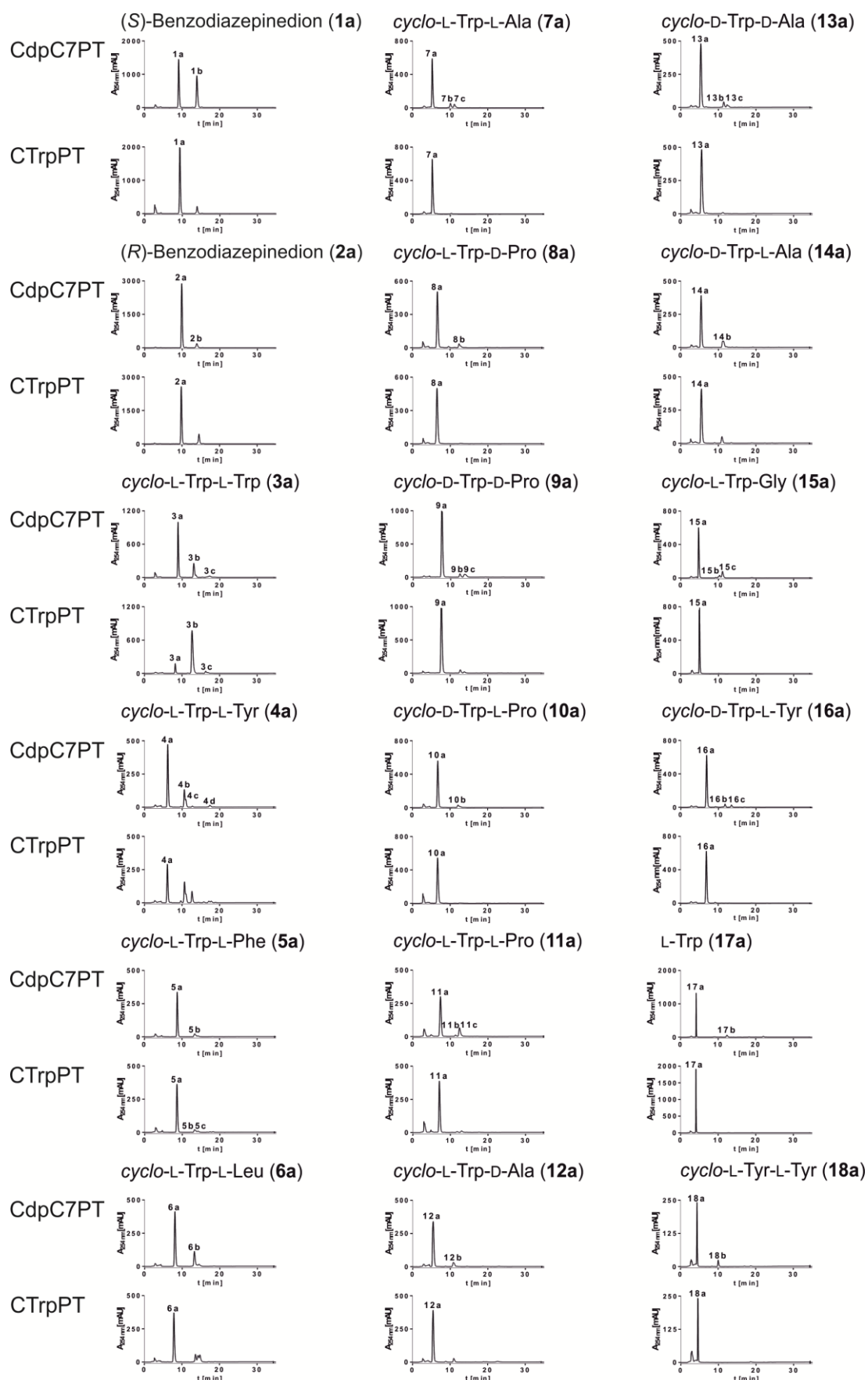
#### 4.1.2.4 Überproduktion von CdpC7PT-His<sub>6</sub> und Enzymaktivitätstests

Zur heterologen Expression des Gens wurden *E. coli* M15 Zellen verwendet. Die Induktion erfolgte unter Zugabe von 0,3 mM IPTG bei 37 °C für 16 h in LB-Medium. Als Ausbeute nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 2,4 mg CdpC7PT-His<sub>6</sub> pro Liter Kultur erhalten werden. Zur Visualisierung erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4-4), welche das Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 51,8 kDa auf der Höhe von etwa 50 kDa aufzeigte.



**Abb. 4-4:** SDS-PAGE zu der Aufreinigung von CdpC7PT-His<sub>6</sub> (pCaW18) in *E. coli* M15 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein nach der Induktion, Spur 3: lösliche Proteinfraction nach der Zentrifugation, Spur 4: Durchfluß-Fraktion, Spur 5: Waschfraktion, Spur 6: Elutionsfraktion.

Da CdpC7PT hohe Sequenzidentitäten zu Prenyltransferasen wie CdpC2PT, BrePT und auch CTrpPT aufzeigte, die überwiegend zyklische Dipeptide akzeptieren, wurde in Analogie die Akzeptanz von 16 verschiedenen tryptophanhaltiger zyklischer Dipeptiden (**1a** - **16a**) in Gegenwart von 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM DMAPP in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C untersucht. Auch die Umsetzungen von L-Tryptophan (**17a**) wurde analysiert (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5: HPLC-Chromatogramme der akzeptierten Substanzen der vergleichenden Enzymaktivitätsassays von CdpC7PT und CTrpPT in Anwesenheit von DMAPP.** Die Substrate sind mit a und die entsprechenden Produkte von CdpC7PT mit b, c und d gekennzeichnet. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 50 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> und CTrpPT-His<sub>6</sub>, 1 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP und 5 mM CaCl<sub>2</sub>.



Hierbei wurde ersichtlich, dass es sich bei (*S*)-Benzodiazepindion (**1a**) um das bestakzeptierte Substrat von CdpC7PT handelt, mit einer Umsetzung von etwa 46 %. Das Enantiomer (*R*)-Benzodiazepindion (**2a**), dem natürlichen Substrat von AnaPT (Yin *et al.*, 2009b) wurde hingegen nur mit ca. 9 % umgesetzt. Umsätze von mehr als 20 % wurden für die Substrate *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**), *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**), *cyclo*-L-Trp-L-Leu (**6a**), *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**11a**) und *cyclo*-L-Trp-Gly (**15a**) unter den gleichen Bedingungen (Kapitel 3.7.7.1) nachgewiesen (Tab. 4-2). Hinsichtlich zyklischer Dipeptide mit enthaltenen D-konfigurierten Aminosäuren zeigt CdpC7PT jedoch eine geringere Akzeptanz zwischen 3,4 und 13,0 % auf. Im Fall von L-Tryptophan konnte lediglich eine Umsetzung von 3 % beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen ausserdem, dass im Falle von **1a** mindestens ein Produktpeak, jedoch in den meisten Fällen zwei oder drei Produktpeaks zu beobachten waren.

Tab. 4-2: Getestete Substrate in Gegenwart von CdpC7PT und CTrpPT und ihre relativen Aktivitäten

Substrat	Umsetzung [%]		Substrat	Umsetzung [%]	
	CdpC7PT	CTrpPT		CdpC7PT	CTrpPT
( <i>S</i> )-Benzodiazepindion ( <b>1a</b> )	45,6	10,9	<i>cyclo</i> -L-Trp-D-Ala ( <b>12a</b> )	3,4	<0,01
( <i>R</i> )-Benzodiazepindion ( <b>2a</b> )	8,9	17,8	<i>cyclo</i> -D-Trp-D-Ala ( <b>13a</b> )	13,0	<0,01
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Trp ( <b>3a</b> )	28,1	89,4	<i>cyclo</i> -D-Trp-L-Ala ( <b>14a</b> )	10,9	<0,01
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Tyr ( <b>4a</b> )	28,2	52,5	<i>cyclo</i> -L-Trp-Gly ( <b>15a</b> )	25,0	1,2
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Phe ( <b>5a</b> )	13,6	11,4	<i>cyclo</i> -D-Trp-L-Tyr ( <b>16a</b> )	9,7	<0,02
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Leu ( <b>6a</b> )	29,2	33,6	L-Tryptophan ( <b>17a</b> )	3,2	<0,01
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Ala ( <b>7a</b> )	19,5	2,2	<i>cyclo</i> -L-Tyr-L-Tyr ( <b>18a</b> )	14,5	<0,01
<i>cyclo</i> -L-Trp-D-Pro ( <b>8a</b> )	10,3	0,7	<i>cyclo</i> -L-Tyr-L-Ser ( <b>19a</b> )	<0,02	<0,02
<i>cyclo</i> -D-Trp-D-Pro ( <b>9a</b> )	6,8	2,0	<i>cyclo</i> -L-Tyr-L-Pro ( <b>20a</b> )	<0,01	<0,01
<i>cyclo</i> -D-Trp-L-Pro ( <b>10a</b> )	8,3	0,9	<i>cyclo</i> -L-Tyr-Gly ( <b>21a</b> )	<0,02	<0,02
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Pro ( <b>11a</b> )	21,3	6,5	L-Tyrosin ( <b>22a</b> )	<0,01	<0,01

Zum Nachweis einer unabhängig voneinander erfolgten Produktbildung wurde exemplarisch *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) mit CdpC7PT über verschiedene Zeiträume inkubiert und analysiert (Abb. 4-6).

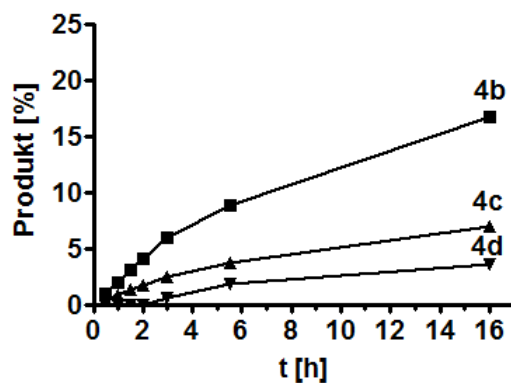


Abb. 4-6: Zeitabhängigkeit der Produktbildung im Reaktionsansatz von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) mit CdpC7PT.

Auch die Akzeptanz von CdpC7PT hinsichtlich verschiedene Prenydonatoren wurde untersucht, wobei weder GPP noch FPP akzeptiert wurden, was wiederum für eine hohe Spezifität von CdpC7PT für DMAPP als Prenyldonor spricht.

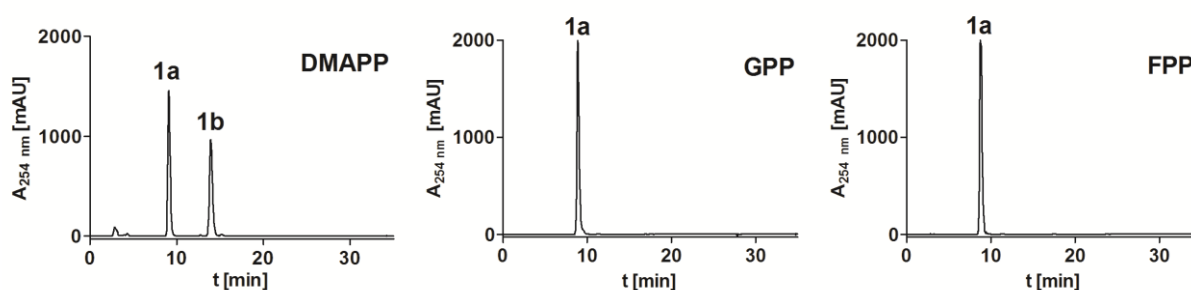
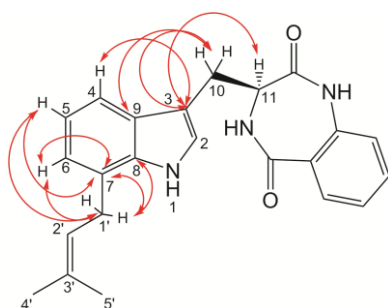


Abb. 4-7: HPLC-Analysen der Reaktionsansätze von CdpC7PT, S-Benzodiazepindion (**1a**) und unterschiedlicher Prenydonatoren.

#### 4.1.2.5 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte von CdpC7PT

Zur Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte (**1b**, **3b - 7b**, **3c**, **4c**, **7c** und **4d**) mittels  $^1\text{H}$ -NMR (Tab. 4-3) und HR-ESI-MS (Tab. 4-4) wurde jeweils ein 20 ml Reaktionsansatz (Kapitel 3.7.7.3) angesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung des Produktes erfolgte mittels HPLC. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Produkte befinden sich im Anhang (Kapitel 7.2: Abb. 7-2 - Abb. 7-15). Der Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der enzymatischen Produkte (**1b**, **3b - 7b**, **3c**, **4c**, **7c** und **4d**) mit den entsprechenden Spektren der Substrate (Daten nicht gezeigt) zeigte eindeutig das Vorhandensein von Signalen eines Prenylrestes. Im Fall der Produkte von **1b** und **3b - 7b** handelte es sich um eine reguläre Prenylierung bei  $\delta_{\text{H}}$  3,41 – 3,54 (d, H-1'), 5,24 – 5,43 (t, H-2'), 1,58 – 1,79 (s, 3H-4') und 1,49 – 1,75 ppm (s, 3H-5'). Die chemische Verschiebung von H-1' deutete auf die Prenylierung eines aromatischen C-Atoms hin. (Winkelblech & Li 2014; Wollinsky *et al.*, 2012c; Yu *et al.*, 2012b; Zou *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde diese Annahme durch das Fehlen des H-4 oder H-7 am Aromaten bekräftigt, welches durch das entsprechende Kopplungsmuster in diesem Bereich abgeleitet werden konnte. Zur Feststellung, ob die Prenylierung an C-4 oder C-7 des Aromaten erfolgte, wurde das Kopplungsmuster der 3 verbliebenen Protonen mit anderen prenylierten Derivaten verglichen (Steffan & Li 2009; Zou *et al.*, 2010) und zusätzlich H-H COSY-, HSQC- und HMBC Analysen beim Produkt **1b** durchgeführt (Anhang Kapitel 7.2: Abb. 7-27 - Abb. 7-34). Hierbei konnte eindeutig



**Abb. 4-8:**  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationen im HMBC-Spektrum von **1b**

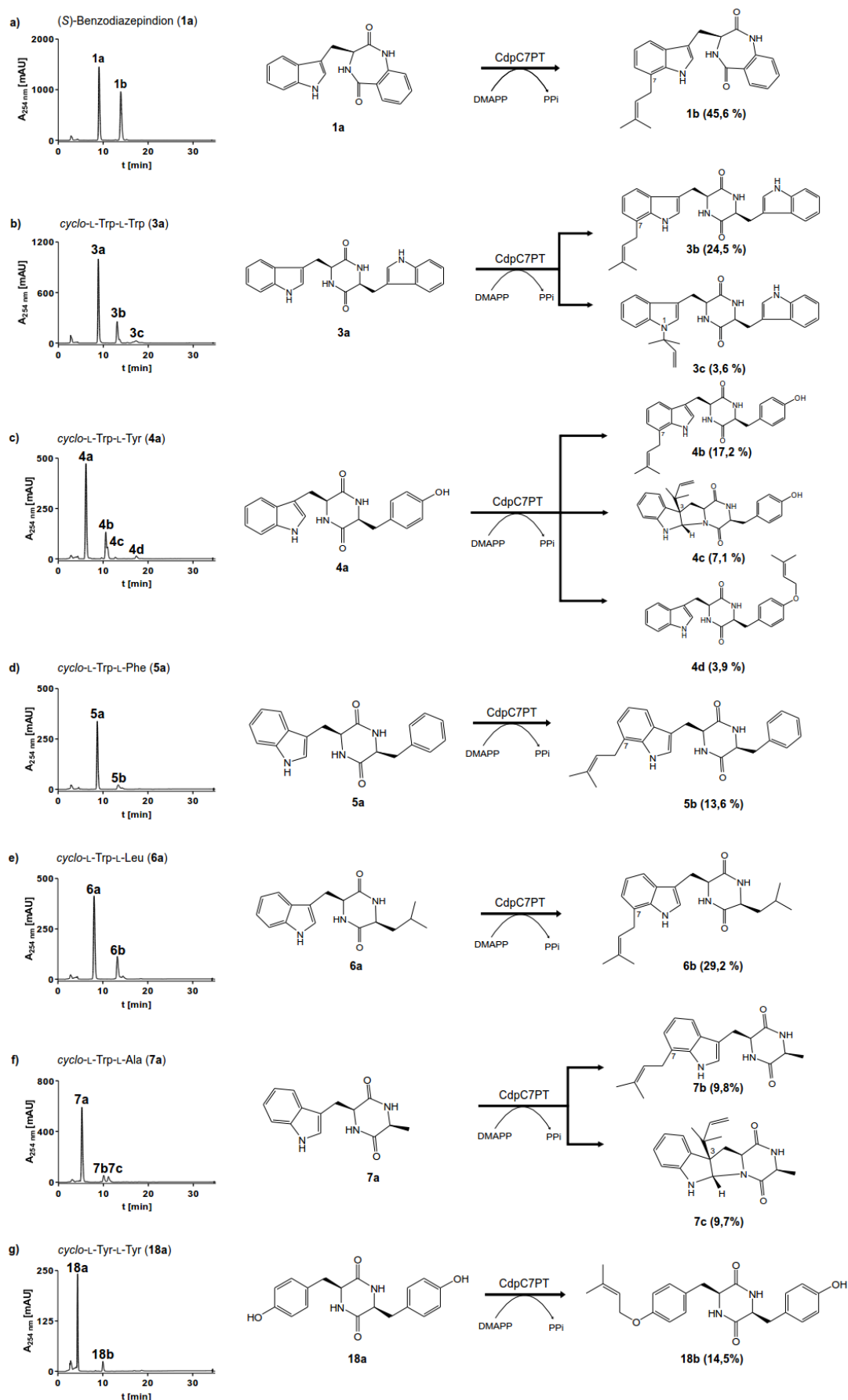
die Prenylierung an Position C-7 des Indolringes bestätigt werden. Und zwar konnte zunächst über die Korrelationen von C-3 mit H-4, H-10a, H-10b und H-11 eine C4-Prenylierung ausgeschlossen werden. Weiterführend wurden dann die Korrelationen von H-1' des Dimethylallylrestes mit C-7 des Indolringes nachgewiesen (Abb. 4-8).

Die spektroskopischen Daten von Produkt **7b** konnten denen der Verbindung Terezin D zugeordnet werden (Wang *et al.*, 1995). Demzufolge konnten alle Produkte der **b**-Reihe als C7-prenylierte Derivate identifiziert und bestätigt werden. Da diese die Hauptprodukte von CdpC7PT repräsentieren, erfolgte die Kategorisierung als zyklische Dipeptid-C7-Prenyltransferase.

Das Produkt **3c** aus dem Inkubationsansatz mit *cyclo*-L-Trp-L-Trp konnte ebenso zweifelsfrei durch vergleichende Studien mit CTrpPT aus *A. oryzae* (Zou *et al.*, 2010) als eine N1-Prenylierung bestimmt werden. Bei den Produkten **4c** und **7c** konnte aufgrund der

charakteristischen Verschiebung der Methylgruppen des Prenylrestes ins Hochfeld in den Bereich um 1 ppm die Prenylierungsposition an C-3 des Indolringes festgemacht werden (Yin *et al.*, 2010a; Yin *et al.*, 2010b; Yu *et al.*, 2013). Es handelt sich hierbei um C3 $\beta$ -prenyliertes *cyclo*-L-Trp-L-Tyr und *cyclo*-L-Trp-L-Ala in *syn-cis* Konfiguration, welches wiederum ein Vergleich mit bereits vorhandenen Daten verdeutlichte (Yin *et al.*, 2010b; Yu *et al.*, 2013). Das Auftreten dieser Produkte ist ein Zeichen für die Abnahme der Regioselektivität hinsichtlich der Prenylierungsposition, vermutlich aufgrund der ungünstigen Positionierung solcher Substrate im aktiven Zentrum des Enzymes. Diese Beobachtung konnte bereits auch bei anderen Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie gemacht werden (Wollinsky *et al.*, 2012c). Im Falle des Produktes **4d** konnten im Bereich des Aromaten keine Veränderungen in Signalanzahl und Kopplungsmuster im Vergleich mit dem Substrat *cyclo*-L-Trp-L-Tyr erkannt werden, jedoch waren Signale für eine reguläre Prenylierung bei  $\delta_{\text{H}}$  4,45 (d, H-1'), 5,37 (td, H-2'), 1,69 (s, 3H-4') und 1,67 ppm (s, 3H-5') vorhanden. Diesbezüglich und aufgrund der Verschiebung von H-1' konnte die Prenylierung nur an einem Heteroatom (N oder O) erfolgt sein. Da die chemische Verschiebung für H-1' bei  $\delta_{\text{H}}$  4,45 ppm deutlich von  $\delta_{\text{H}}$  4,68 ppm eines Vergleichsspektrum von *cyclo*-N1-dimethylallyl-L-Trp-L-Tyr (Yin *et al.*, 2007) abwich, liegt stattdessen eine O-Prenylierung vor. Aus diesem Grund wurde daraufhin auch die Aktivität von CdpC7PT hinsichtlich L-Tyrosin (**22a**) und tyrosinhaltiger zyklischer Dipeptide (**18a** - **21a**) ohne Tryptophanrest untersucht und es konnte lediglich eine entsprechende Umsetzung von 14,5 % bei *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**) beobachtet werden (Abb. 4-5). Hierbei konnte im Vergleich zum Produkt **18b** weder eine Änderung in der Anzahl der aromatischen Protonen, noch im Kopplungsmuster beobachtet werden. Die chemische Verschiebung von H-1' deutet auch hier auf eine O-Prenylierung hin.

In Abb. 4-9 sind alle 11 isolierten Produkte (**1b**, **3b** - **7b**, **18b**, **3c**, **4c**, **7c**, und **4d**) in Verbindung mit den jeweiligen relativen Umsätzen und den zugehörigen Prenylierungsreaktionen ergänzend dargestellt.



**Abb. 4-9: HPLC-Chromatogramme von den 7 ausgewählten Inkubationsansätzen, deren Produkte isoliert und aufgeklärt wurden (links) und die zugehörigen Prenylierungsreaktionen (rechts). Die Ausbeuten befinden sich in den Klammern unter der jeweiligen Produktstruktur.**

Tab. 4-3: <sup>1</sup>H-NMR-Daten der enzymatischen Produkte von CdpC7PT

Substanz										
	Pos.	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	CD <sub>3</sub> OD	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	CDCl <sub>3</sub>	CD <sub>3</sub> OD	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	CDCl <sub>3</sub>	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]
(S)-7-dimethylallyl-Benzodiazepindion (1b; CD <sub>3</sub> OD)	NH-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	124,2	7,13; s	6,55; s	6,53; d; 2,2	8,03; s	6,57 s	7,05; s	6,69; s	5,52; s
	3	110,3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	116,0	7,26; dd; 7,7; 1,2	7,33; d; 7,8	7,41; d; 7,9	7,54; 7,9	7,47; d; 8,0	7,44; d; 7,7	7,14; d; 7,5	7,14; d; 7,5
	5	119,6	6,88; t; 7,4	7,08; t; 7,0	7,08; t; 7,5	7,11; t; 7,3	7,09; t; 7,4	7,00; t; 7,6	6,75; t; 7,5	6,75; t; 7,5
	6	121,1	6,85; dd; 7,1; 1,1	6,89; d; 7,0	7,02; d; 7,1	7,14; t; 7,6	7,06; t; 7,7	6,92; d; 6,9	7,14; t; 7,6	7,10; td; 7,7; 1,1
	7	125,3 <sup>a</sup>	-	-	-	-	7,44; d; 8,0	-	7,48; d; 8,3	6,59; d; 7,9
	8	136,2	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	127,7	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	24,5	3,37; dd; 15,1; 5,8 3,13; dd; 15,1; 8,9	2,94; dd; 14,3; 3,9 2,36; dd; 14,3; 6,6	3,24; dd; 14,6; 3,2 2,39; dd; 14,6; 8,6	3,19; dd; 14,5; 3,5 2,44; dd; 14,5; 8,1	2,97 dd; 14,3; 3,9 2,25 dd; 14,3; 6,8	3,04; dd; 14,5; 4,1 2,92; dd; 14,5; 5,2	-	2,52; dd; 12,6; 6,1 2,39; dd; 12,6; 11,4
NH-12	11	53,8	4,09; dd; 9,0; 5,9	4,08; dd; 6,6; 3,9	4,19; m 5,70; s	4,19; d; 7,7 5,70; s	4,07; dd; 7,3; 3,9	4,18; t; 4,7	-	3,92; dd; 11,1; 6,2
	13	170,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	126,5	-	4,00; dd; 7,7; 3,5	4,19; m	4,19; d; 7,7	4,05; dd; 7,8; 4,4	3,80; dd; 9,2; 3,5	-	4,15; dd; 10,5; 2,1
	15	137,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	NH-15	-	-	-	5,73; s	5,74; s	-	-	5,55; s	5,55; s
	17	173,2	-	2,88; dd; 14,3; 3,5 1,91; dd; 14,3; 7,7	3,24; dd; 14,6; 3,2 2,51; dd; 14,6; 8,3	3,22; dd; 14,6; 3,4 2,39; dd; 14,6; 8,5	2,90; dd; 14,2; 3,9 2,09; dd; 14,2; 6,8	2,52; dd; 13,6; 3,7 1,24; dd; 13,6; 9,2	3,48; dd; 14,6; 3,7 2,74; dd; 14,6; 10,3	-
	18	121,7	7,11; d; 8,2	-	-	-	-	-	-	-
	19	133,7	7,52; ddd; 8,2; 7,3; 1,6 7,23; td; 7,6; 1,0	6,31 s	6,60; d; 2,2	6,46; s	6,39; s	6,59; d; 8,6 6,37; d; 8,4	7,06; d; 8,5 6,80; d; 8,4	-
	20	125,3 <sup>a</sup>	-	-	8,07; s	-	-	-	-	-
	NH-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1'	21	131,1	7,77; dd; 7,9; 1,0	-	-	-	7,31; d; 8,2	6,37; d; 8,4	-	-
	22	-	-	7,29; d; 8,1	7,36; d; 8,2	7,39; d; 8,0	7,01; td; 7,2; 0,8	6,37; d; 8,4	6,80; d; 8,4	-
	23	-	-	6,99; t; 7,3	7,22; t; 7,5	7,21; t; 7,5	7,01; t; 7,6	6,59; d; 8,6	7,06; d; 8,5	-
	24	-	-	6,96; t; 7,5	7,16; t; 7,6	7,14; t; 7,6	7,01; t; 7,6	-	-	-
	25	-	-	7,41; d; 8,0	7,58; d; 8,0	7,57; d; 8,1	7,62; d; 7,9	-	-	-
	1'	30,0	3,51 d; 7,2	3,47; d; 7,0	3,52; d; 7,3	5,19; d; 10,8 5,16; 17,9	5,14; d; 10,8 5,11; d; 17,6	3,49; d; 7,3	-	5,13; d; 10,8 5,08; d; 17,4
	2'	122,4	5,39; t sept; 7,2; 1,4	5,30; t sept; 7,2; 1,4	5,30; t; 7,1	6,06; d; 17,6; 10,7	6,07; dd; 17,6; 10,8	5,30; t sept; 7,3; 1,4	-	5,95; dd; 17,3; 10,7
	3'	133,2	-	1,63; s	1,78; s	1,71; s	1,69; s	1,66; s	-	1,11; s
	4'	17,2 <sup>b</sup>	1,73; s	1,71; s	1,71; s	1,68; s	1,67; s	1,56; s	-	1,00; s
	5'	25,3 <sup>b</sup>	1,73; s	1,53; s	-	-	-	-	-	-

Spektrometer: JEOL ECA-500. Chemische Verschiebung (δ) sind in ppm und Kopplungskonstanten in Hz angegeben. \* überlappende Signale mit dem Lösungsmittel.

Tab. 4-3 (Fortsetzung): <sup>1</sup>H-NMR-Daten der enzymatischen Produkte von CdpC7PT

Substanz						
	cyclo-L-Trp-L-O-dimethylallyl-Tyr (4d); CD <sub>3</sub> OD	cyclo-L-7-dimethylallyl-Trp-L-Phe (5b) DMSO-d <sub>6</sub>	cyclo-L-7-dimethylallyl-Trp-L-Leu (6b); CD <sub>3</sub> OD	cyclo-L-7-dimethylallyl-Trp-L-Ala (7b); CD <sub>3</sub> OD	cyclo-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Ala (7c); CD <sub>3</sub> OD	cyclo-L-O-dimethylallyl-Tyr-L-Tyr (18b); DMSO-d <sub>6</sub>
Pos.	δ <sub>H</sub> ; multi.; / [Hz]	δ <sub>H</sub> ; multi.; / [Hz]	δ <sub>H</sub> ; multi.; / [Hz]	δ <sub>H</sub> ; multi.; / [Hz]	δ <sub>H</sub> ; multi.; / [Hz]	δ <sub>H</sub> ; multi.; / [Hz]
NH-1	-	-	-	-	-	-
2	7,03; s	6,97; s	7,06; s	7,07; s	5,54; s	6,86; d; 7,0
3	-	-	-	-	-	6,76; d; 6,4
4	7,58; d; 7,9	7,31; d; 7,8	7,43; d; 8,0	7,43; d; 7,9	7,20; dd; 7,5; 0,7	-
5	7,13; t; 7,6	6,92; t; 7,5	6,93; t; 7,5	6,93; t; 7,5	6,72; td; 7,5; 1,0	6,76; d; 6,4
6	7,06; t; 7,3	6,84; d; 6,8	6,87; dd; 7,2; 0,9	6,86; dd; 7,1; 0,6	7,06; td; 7,7; 1,2	6,86; d; 7,0
7	7,34; d; 8,1	-	-	-	6,59; d; 7,6	3,29*
8	-	-	-	-	-	3,22; dd; 11,1; 6,0
10	3,02; dd; 14,1; 4,2	2,81; dd; 14,5; 4,3	3,48; dd; 14,7; 3,6	-	-	3,84; t; 5,4
11	2,68; dd; 14,1;	2,58; dd; 14,5; 5,4	3,10; dd; 14,7; 4,6	3,44; dd; 14,7; 3,8	2,50; dd; 12,7; 6,3	-
14	4,15; t; 5,1	4,00; t; 4,9	4,27; ddd; 4,4; 3,4; 0,9	3,13; dd; 14,7; 4,5	2,39; dd; 12,7; 11,3	-
14	3,92; dt; 12,5; 6,2	3,81; dd; 7,7; 4,6	3,56; ddd; 9,9; 4,1; 0,9	4,26; td; 4,2; 1,0	3,98 ddd; 11,3; 6,3; 2,1	3,80; t; 5,2
NH-12	-	-	-	-	-	2,08; dd; 13,3; 6,3
NH-15	-	-	-	-	-	1,98; m
16	-	-	-	-	-	-
17	2,59; dd; 13,7; 3,8	2,35; dd; 13,5; 4,2	1,13; m	-	1,38; d; 6,9	-
17	1,54; dd; 13,7; 8,2	1,53; dd; 13,5; 5,6	0,64; ddd; 13,9; 9,7; 4,3	0,34; d; 7,0	-	-
18	-	-	1,75; dd; 7,5; 1,0	-	-	-
19	6,75; d; 8,6	7,12; dd; 5,0; 1,8	0,59; d; 6,6	-	-	6,60; d; 6,7
20	6,56; d; 8,6	6,57; dd; 6,5; 2,8	0,44; d; 6,6	-	-	6,75; d; 6,4
21	-	7,26*	-	-	-	-
22	6,56; d; 8,6	6,57; dd; 6,5; 2,8	-	-	-	-
23	6,75; d; 8,6	7,12; 5,0; 1,8	-	-	-	-
1'	4,45; d; 6,5	3,41; d; 7,3	3,52; d; 7,3	-	-	-
2'	5,37; td; 6,8; 1,8	5,24; t sept; 7,3; 1,3	5,43; t sept; 7,2; 1,4	3,52; d; 7,2	5,14; dd; 10,9; 1,3	4,37; d; 5,8
4'	1,69; s	1,58; s	1,76; s	5,39; t sept; 7,2; 1,4	5,12; dd; 17,4; 1,3	5,27; t; 7,0
5'	1,67; s	1,49; s	1,71; s	1,73; s	6,06; dd; 17,4; 10,9	1,58; s
				1,73; s	0,99; s	1,53; s

Spektrometer: JEOL ECA-500. Chemische Verschiebung (δ) sind in ppm und Kopplungskonstanten in Hz angegeben. \* überlappende Signale mit dem Lösungsmittel.

Die errechneten Massen der isolierten enzymatischen Produkte von CdpC7PT wurden zusätzlich durch HR-EI-MS bestätigt (Tab. 4-4, Anhang Kapitel 7.2: Abb. 7-16 - Abb. 7-26). Dabei zeigten alle isolierten Produkte (**1b**, **3b** - **7b**, **18b**, **3c**, **4c**, **7c**, und **4d**) eine molekulare Masse auf, die um 68 kDa größer war als die des jeweiligen Substrates, was auf eine Monoprenylierung der Struktur hindeutet.

**Tab. 4-4: HR-EI-MS Daten der enzymatischen Produkte von CdpC7PT**

Enzymatische Produkte von CdpC7PT	Summenformel	[M <sup>+</sup> ]		Abweichung (ppm)
		Berechnet	Gemessen	
( <i>S</i> )-7-dimethylallyl-Benzodiazepindion ( <b>1b</b> )	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	373,1790	373,1769	5,7
<i>cyclo</i> -L-7-dimethylallyl-Trp-L-Trp ( <b>3b</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	440,2212	440,2182	6,9
<i>cyclo</i> -L- <i>N</i> 1-tert-prenyl-Trp-L-Trp ( <b>3c</b> )	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	440,2212	440,2267	12,5
<i>cyclo</i> -L-7-dimethylallyl-Trp-L-Tyr ( <b>4b</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	417,2052	417,2051	0,4
<i>cyclo</i> -L-3-tert-prenyl-Trp-L-Tyr ( <b>4c</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	417,2052	417,2039	3,3
<i>cyclo</i> -L-Trp-L- <i>O</i> -dimethylallyl-Tyr ( <b>4d</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	417,2052	417,2067	3,3
<i>cyclo</i> -L-7-dimethylallyl-Trp-L-Phe ( <b>5b</b> )	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	401,2103	401,2091	2,9
<i>cyclo</i> -L-7-dimethylallyl-Trp-L-Leu ( <b>6b</b> )	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	367,2260	367,2265	1,4
<i>cyclo</i> -L-7-dimethylallyl-Trp-L-Ala ( <b>7b</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	325,1790	325,1768	6,8
<i>cyclo</i> -L-3-tert-prenyl-Trp-L-Ala ( <b>7c</b> )	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	325,1790	325,1763	8,4
<i>cyclo</i> -L- <i>O</i> -dimethylallyl-Tyr-L-Tyr ( <b>18b</b> )	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	394,1893	394,1875	4,5

Zusammenfassend konnten somit von 11 isolierten Produkten (**1b**, **3b** - **7b**, **18b**, **3c**, **4c**, **7c** und **4d**) die Struktur mittels <sup>1</sup>H-NMR und HR-EI-MS aufgeklärt werden.



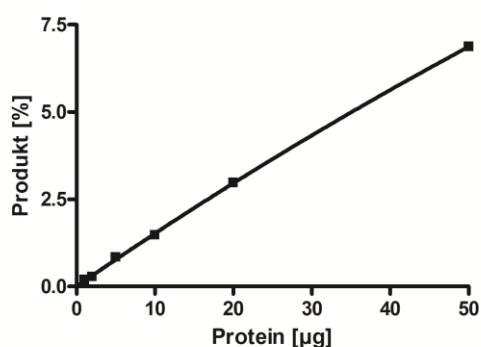
#### 4.1.2.6 Vergleich der Substratspezifität von CdpC7PT und CTrpPT

Da die Strukturaufklärung die identischen Hauptprodukte von CdpC7PT und CTrpPT mit *cyclo*-L-Trp-L-Trp aufzeigte, wurden vergleichende Enzymassays unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Kapitel 3.7.7.1). Beim überwiegenden Teil der Substrate konnte ein jeweiliger Hauptproduktpeak mit identischer Retentionszeit bei beiden Prenyltransferasen beobachtet werden (Abb. 4-5). Ein Vergleich der relativen Aktivitäten beider Enzyme ist in Tab. 4-2 aufgeführt. Dabei wird ersichtlich, dass die Enzyme unterschiedliche Substratpräferenzen aufweisen. Im Fall von CTrpPT ist eine klare Substratpräferenz erkennbar und die bestakzeptierten Substrate sind *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**) mit einer Umsetzung von 89 %, gefolgt von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**), *cyclo*-L-Trp-L-Leu (**6a**) und *cyclo*-L-Trp-L-Phe (**5a**) mit jeweils 53, 34 und 11 %. Auf der anderen Seite werden all diese Substanzen ebenso von CdpC7PT akzeptiert, jedoch auch noch weitere zyklische Dipeptide, wie die Stereoisomere von *cyclo*-Trp-Pro (**8a** - **11a**) und *cyclo*-Trp-Ala (**7a**, **12a** - **14a**), ebenso wie *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**), welche von CTrpPT kaum bis gar nicht akzeptiert werden. Das bestakzeptierte Substrat von CdpC7PT ist (S)-Benzodiazepindion (**1a**) mit einer Umsetzung von 45,6 %, bei welchem CTrpPT lediglich 24 % dieses Umsatzes erzielt. Demzufolge zeigt CdpC7PT eine breitere Substratspezifität, jedoch in den meisten Fällen auch eine geringere Umsetzung auf.

#### 4.1.2.7 Biochemische Eigenschaften von CdpC7PT und Bestimmung der kinetischen Parameter

Durch Größenausschlusschromatographie konnte das Molekulargewicht von CdpC7PT-His<sub>6</sub> in seinem nativen Zustand als 62 kDa bestimmt werden. Die aktive Form des Proteins liegt demzufolge als Monomer vor. Die Produktbildung bei einem 100 µl Reaktionsansatz befindet sich mit 20 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> und 120 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abb. 4-10).

A)



B)

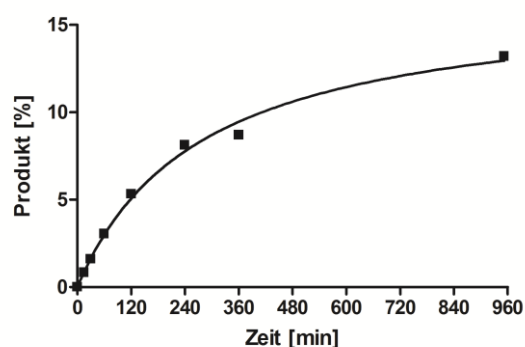
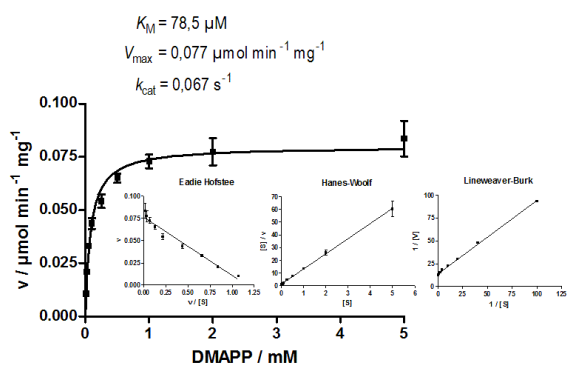


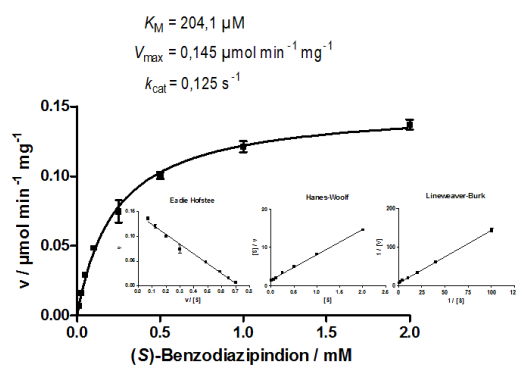
Abb. 4-10: Abhängigkeit der Produktbildung der CdpC7PT-Reaktion von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit.

Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 1 mM (S)-Benzodiazepindion (**1a**), 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und unterschiedliche Mengen CdpC7PT-His<sub>6</sub> mit einer Inkubationszeit von 60 min (Abb. 4-10; A) bzw. 20 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub> mit variierenden Inkubationszeiten (Abb. 4-10; B). Zur Untersuchung der Abhängigkeit gegenüber DMAPP und 7 ausgewählten zyklischen Dipeptiden (**1a**, **3a** - **7a**, **18a**) wurden sowohl die Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_M$ ) und Wechselzahlen ( $k_{cat}$ ) anhand der Eadie-Hofstee-, Hanes-Woolf- und Lineweaver-Burk-Transformationen bestimmt. Dabei folgten, die von CdpC7PT katalysierten Reaktionen offenbar der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 4-11).

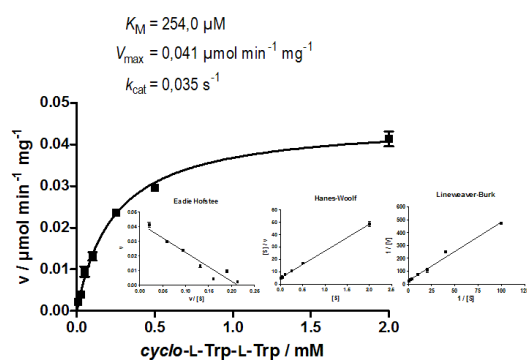
A)



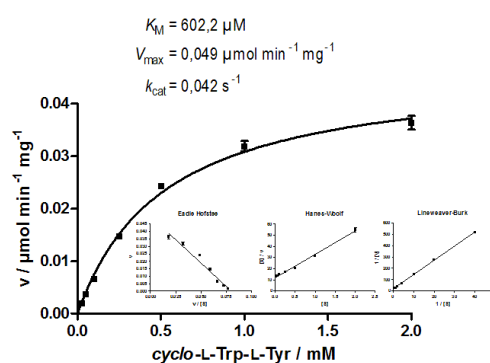
B)



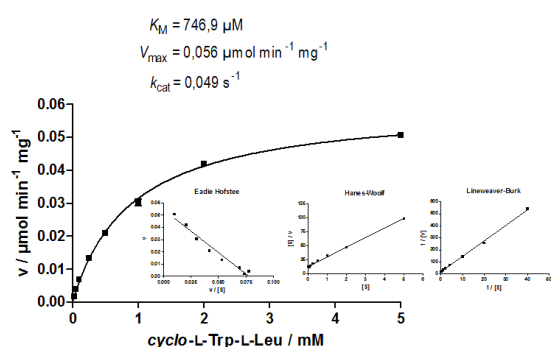
C)



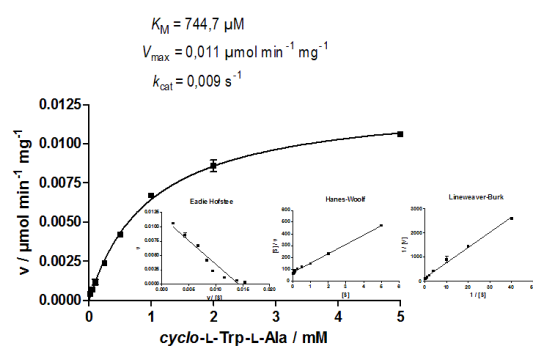
D)



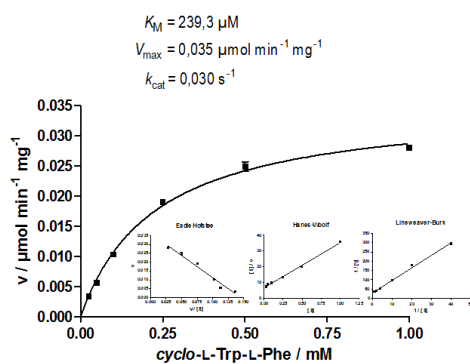
E)



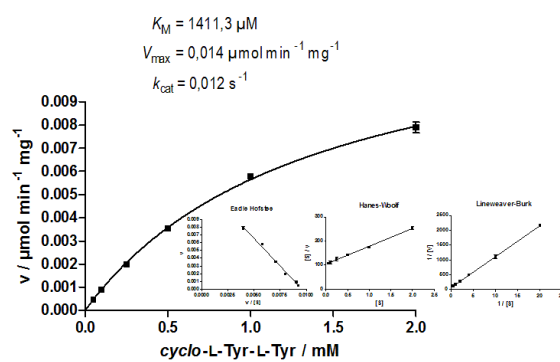
F)



G)



H)



**Abb. 4-11: Bestimmung der kinetischen Parameter der von CdpC7PT katalysierten Reaktionen. A) DMAPP B) (S)-Benzodiazepindion, C) *cyclo*-L-Trp-L-Trp, D) *cyclo*-L-Trp-L-Tyr, E) *cyclo*-L-Trp-L-Leu, F) *cyclo*-L-Trp-L-Ala, G) *cyclo*-L-Trp-L-Phe und H) *cyclo*-L-Trp-L-Tyr.**

In Tab. 4-5 sind die ermittelten kinetischen Parameter zusammenfassend dargestellt.

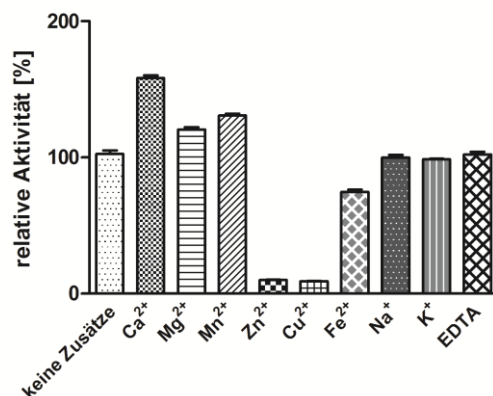
**Tab. 4-5: Kinetische Parameter von CdpC7PT**

Substrate	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\max}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ % ]
DMAPP	78,5	0,077	0,067	847,5	138,3
(S)-Benzodiazepindion ( <b>1a</b> )	204,1	0,145	0,125	612,8	100,0
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Trp ( <b>3a</b> )	254,0	0,041	0,035	139,3	22,7
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Tyr ( <b>4a</b> )	602,2	0,049	0,042	70,0	11,4
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Phe ( <b>5a</b> )	239,3	0,035	0,030	126,6	20,7
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Leu ( <b>6a</b> )	746,9	0,056	0,049	65,3	10,6
<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Ala ( <b>7a</b> )	744,7	0,011	0,009	12,3	2,0
<i>cyclo</i> -L-Tyr-L-Tyr ( <b>18a</b> )	1411,3	0,014	0,012	8,3	1,3

CdpC7PT zeigte eine hohe Affinität zu seinem Prenyldonor DMAPP mit einem  $K_M$ -Wert von 78,5  $\mu\text{M}$  und einer Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  von 0,067  $\text{s}^{-1}$ . Im Falle der aromatischen Substrate lag die höchste Affinität bei (S)-Benzodiazepindion (**1a**) mit einem  $K_M$ -Wert von 204,1  $\mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}$  bei 0,125  $\text{s}^{-1}$ . Für die anderen Tryptophan-haltigen zyklischen Dipeptide (**3a** - **7a**) lagen die  $K_M$ -Werte im Bereich zwischen 239,3  $\mu\text{M}$  und 746,9  $\mu\text{M}$  und Wechselzahlen zwischen 0,009 und 0,049  $\text{s}^{-1}$  (Abb. 4-11). Ein deutlich höherer  $K_M$ -Wert von 1411,3  $\mu\text{M}$  wurde für *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**) ermittelt mit einer relativen katalytischen Effizienz von lediglich 1,3 % vergleichend zu (S)-Benzodiazepindion (**1a**).

#### 4.1.2.8 Ionenabhängigkeit der CdpC7PT-Reaktion

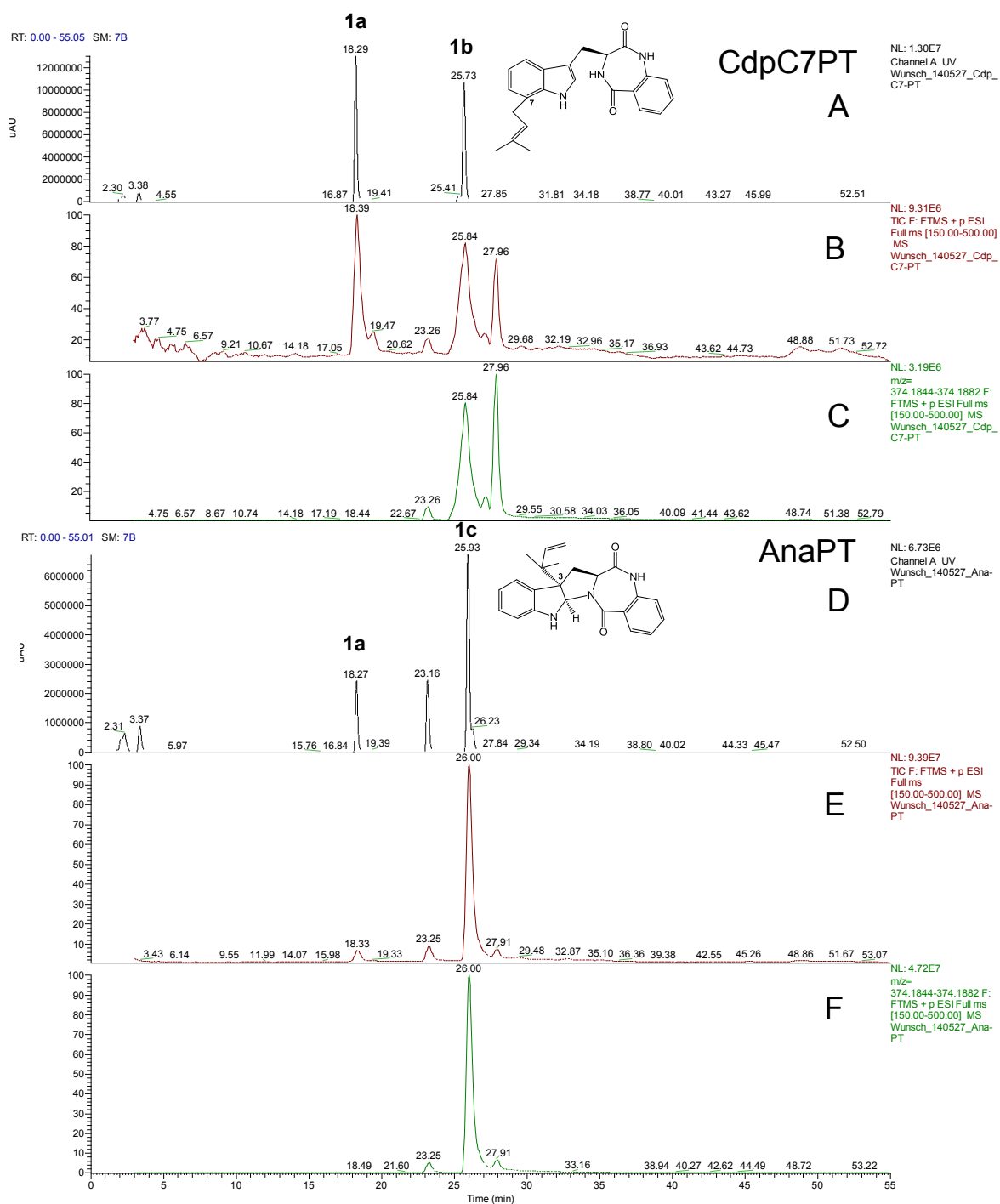
Die Ionenabhängigkeit der CdpC7PT-Reaktion wurde durch die Inkubation von (S)-Benzodiazepindion (**1a**) mit CdpC7PT-His<sub>6</sub> und 1 mM DMAPP in Anwesenheit des Komplexbildners EDTA oder verschiedenen Metallionen untersucht (Abb. 4-12). Kontrollen wurden mitgeführt in Form von Reaktionsansätzen ohne Metallionen bzw. mit EDTA und wurden einer relativen Aktivität von 100 % gleichgesetzt. Durch die Zugabe von 5 mM Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> konnte eine leichte Zunahme der Aktivität auf 158, 131 und 120 % beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war ein deutlicher Rückgang der Enzymaktivität auf Werte von 75, 10 und 9 % in Gegenwart der Ionen Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> zu verzeichnen. Ein signifikanter Einfluß der einfach-geladener Ionen, wie Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> auf die Reaktion war nicht erkennbar.



**Abb. 4-12: Graphische Darstellung der Ionenabhängigkeit der CdpC7PT-Reaktion.** Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 10 µg CdpC7PT-His<sub>6</sub>, 1 mM DMAPP, 1 mM (S)-Benzodiazepindion (**1a**) und 5 mM des entsprechenden Zusatzes. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C.

#### 4.1.2.9 Kultivierung von *A. terreus* und Identifizierung von C7-prenylierten zyklischen Dipeptiden

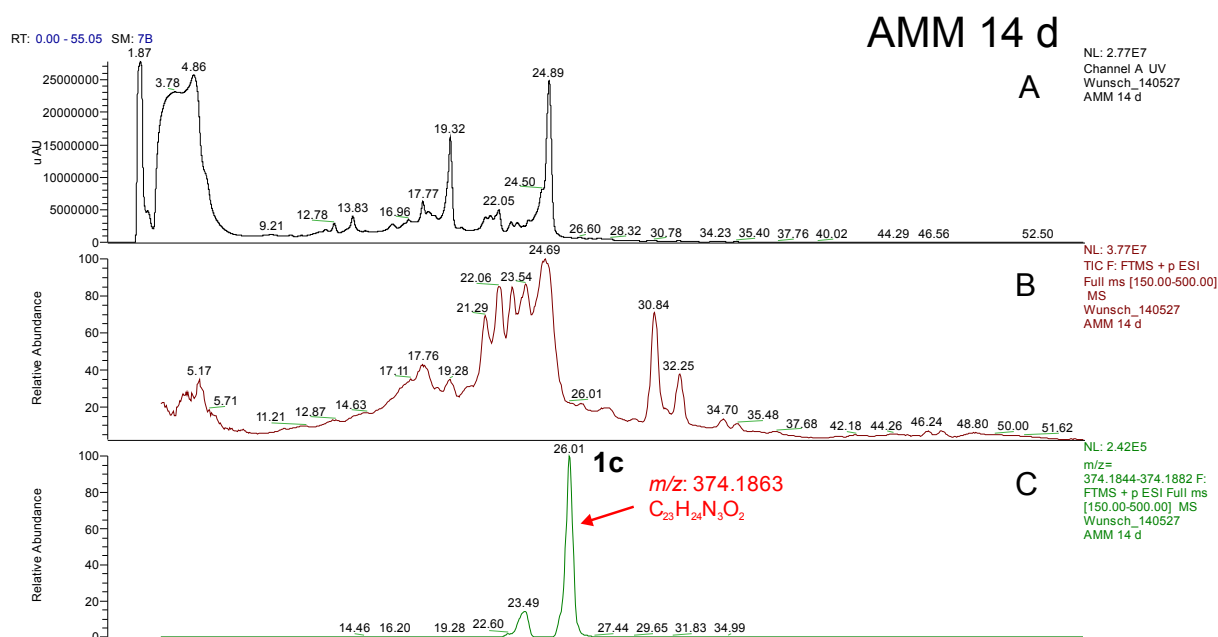
Zur Analyse der Sekundärmetabolitproduktion wurde *A. terreus* DSM 1958 für 7 und 14 Tage in AMM Medium unter Schütteln kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der gewonnenen Kulturfiltrate mittel LC/MS. Das Augenmerk lag hierbei auf der Identifizierung von prenylierten Dipeptiden, die möglicherweise durch CdpC7PT generiert wurden. Aufgrund der ebenso von *A. terreus* produzierten Prenyltransferase AnaPT, welche sich für die Biosynthese von Aszonalin verantwortlich zeichnet, wurden vergleichende Enzymassays als Kontrollen mit (S)-Benzodiazepindion (**1a**) mitgeführt (Abb. 4-13).



**Abb. 4-13: Graphische Darstellung der LC/MS Daten der Kontrollansätze zur CdpC7PT- und AnaPT-Reaktionen mit (S)-Benzodiazepindion.** Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 40 µg Enzym, 1 mM DMAPP, 1 mM (S)-Benzodiazepindion (**1a**) und 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C. A/D: UV-Spektrum der HPLC des jeweiligen Ansatzes. B/E: Detektion von [M+H]<sup>+</sup> Ionen mit m/z im Bereich von 150 - 500. C/F: Raster zur Identifizierung von prenyliertem (S)-Benzodiazepindion (**1a**).

In einer ersten Analyse der 14 Tage-Kultur konnte eindeutig das Vorhandensein des [M+H]<sup>+</sup> Ion m/z = 374,1863 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) von Aszonalin, dem natürlichen AnaPT-Produkt mit (R)-

Benzodiazepindion (**2a**) beobachtet werden, jedoch nicht das Produkt von (S)-Benzodiazepindion (**1a**) mit CdpC7PT (Abb. 4-14).



**Abb. 4-14: Graphische Darstellung der LC/MS Daten der 14 Tage Kultur.** A: UV-Spektrum der HPLC. B: Detektion von  $[M+H]^+$  Ionen mit m/z im Bereich von 150 - 500. C: Raster zur Identifizierung von prenyliertem (S)-Benzodiazepindion (**1a**).

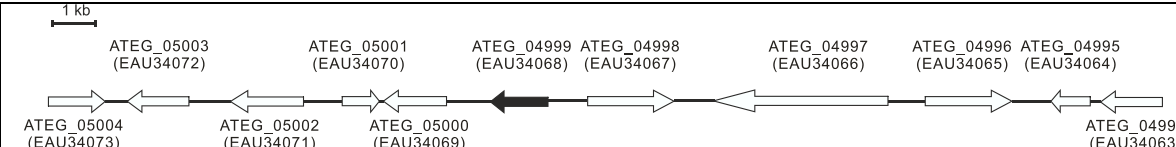
Weiterführende Untersuchungen der Extrakte der 7 und 14 Tage Kulturen bestätigten die Anwesenheit von Aszonalin und prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Ala. Andere Ionen prenylierter Derivate von *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**), *cyclo*-L-Trp-L-Phe (**5a**), *cyclo*-L-Trp-L-Leu (**6a**), sowie *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) konnten nicht detektiert werden (Anhang 7.3: Abb. 7-35 und Abb. 7-36).

### 4.1.3 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU34068 aus *A. terreus* DSM 1958

#### 4.1.3.1 Einleitung

Das putative Prenyltransferasegen *ATEG\_04999* ist auf dem Supercontig 7 von *A. terreus* NIH 2624 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NT\_165930.1) lokalisiert. Die durch NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorhergesagte Größe beträgt 1323 bp (182947 bp – 184269 bp). Das abgeleitete Genprodukt umfasst 424 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 47,6 kDa. EAU34068 zeigt laut Blast-Analysen deutliche Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene zu anderen Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie auf. Im Falle der zyklischen Dipeptid-akzeptierenden Prenyltransferasen AnaPT aus *N. fischeri* (Yin *et al.*, 2009b) und CTrpPT aus *A. oryzae* (Zou *et al.*, 2010) betragen die Sequenzidentitäten 42 % und 29 %, aber auch zur Tryptophan-preferierenden Prenyltransferase FgaPT2 aus *A. fumigatus* (Unsöld & Li 2005) sind es gleichermaßen 29 %. Die Analyse von *ATEG\_04999* und der benachbarten Gene (Tab. 4-6) zeigte weder signifikanten Übereinstimmungen zu bereits identifizierten Biosynthese-Genclustern auf, noch befinden sich Gene für die Biosynthese von Sekundärmetabolitgrundstrukturen, wie NRPS oder PKS in unmittelbarer Umgebung.

Tab. 4-6: genetischer Kontext von *ATEG\_04999* auf dem Supercontig 7 (NT\_165930.1)

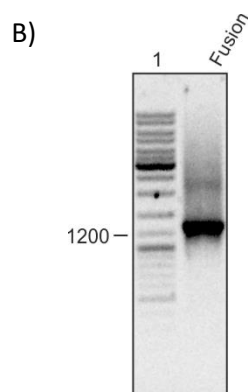
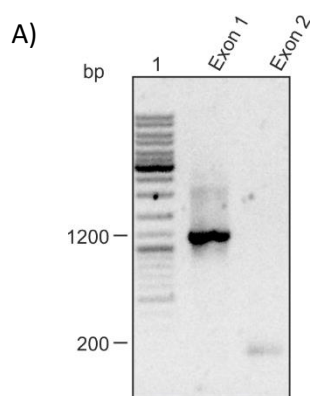
				
Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>ATEG_05004</i>	EAU34073	323	193562-194865	Catechol-Dioxygenase
<i>ATEG_05003</i>	EAU34072	410	191629-193045	Exoglukanase
<i>ATEG_05002</i>	EAU34071	541	189005-190682	Exoglukanase
<i>ATEG_05001</i>	EAU34070	284	187284-188138	Formyltetrahydrofolat-Deformylase
<i>ATEG_05000</i>	EAU34069	409	185742-187191	Ammonium-Transporter
<b><i>ATEG_04999</i></b>	<b>EAU34068</b>	<b>424</b>	<b>182947-184269</b>	<b>Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie</b>
<i>ATEG_04998</i>	EAU34067	629	180083-182066	ATPase-ähnliches Protein
<i>ATEG_04997</i>	EAU34066	1186	175138-179147	Transkriptionsfaktor-ähnliches Protein
<i>ATEG_04996</i>	EAU34065	642	172321-174310	Fructosyltransferase-ähnliches Protein
<i>ATEG_04995</i>	EAU34064	283	170530-171432	Transmembranprotein
<i>ATEG_04994</i>	EAU34063	425	168873-170290	Amidohydrolase



Anhand der erhaltenen Angaben konnte demnach kein putatives Gencluster identifiziert werden. Somit waren keine Rückschlüsse auf die Funktion von EAU34068 möglich.

#### 4.1.3.2 Amplifikation von *ATEG\_04999* aus genomischer DNA von *A. terreus* DSM 1958

Strukturell ist das Gen *ATEG\_04999* aus 2 Exons in den Größenordnungen von 1148 und 127 bp aufgebaut, welche durch ein Intron von 48 bp voneinander getrennt sind. Die einzelnen Exons wurden durch Fusions-PCR (Kapitel 3.6.4) in einer ersten PCR-Runde separat amplifiziert und anschließend in einer weiteren PCR-Runde vereinigt. Hierbei wurde auf das High Fidelity PCR-Kit (Roche) zurückgegriffen. Die Amplifikation des 1. Exons erfolgte durch die Primerkombination CaW\_04999-1/ CaW\_04999-3 (Abb. 4-15; A: Exon 1) und für das 2. Exon wurden die Primer CaW\_04999-2/ CaW\_04999-4 (Abb. 4-15; A: Exon 2) verwendet (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6). Der Primer CaW\_04999-4 vermittelt hierbei gleichzeitig eine Mutation im Stopcodon von *ATEG\_04999* um den Leserahmen zu verlängern und das Genprodukt zur Aufreinigung um einen Histidin-tag zu erweitern. Für die Fusion beider Exons wurde jeweils das PCR-Produkt 1 und das PCR-Produkt 2 als Vorlage im Zusammenhang mit dem flankierenden Primerpaar CaW\_04999-1 und CaW\_04999-4 verwendet (Abb. 4-15; B: Fusion).



Exon 1	94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	1,5 min	5 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

Exon 2	94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	1 min	5 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

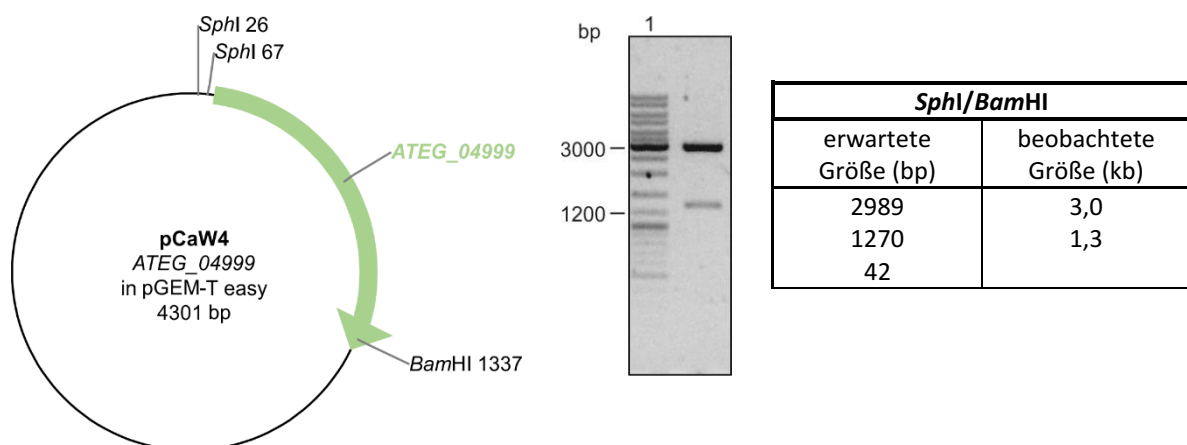
Fusionon	94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	2 min	5 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
Exon 1	1182	1,2
Exon 2	152	0,2
Fusion	1284	1,3

Abb. 4-15: Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *ATEG\_04999* aus genomischer DNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2. Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

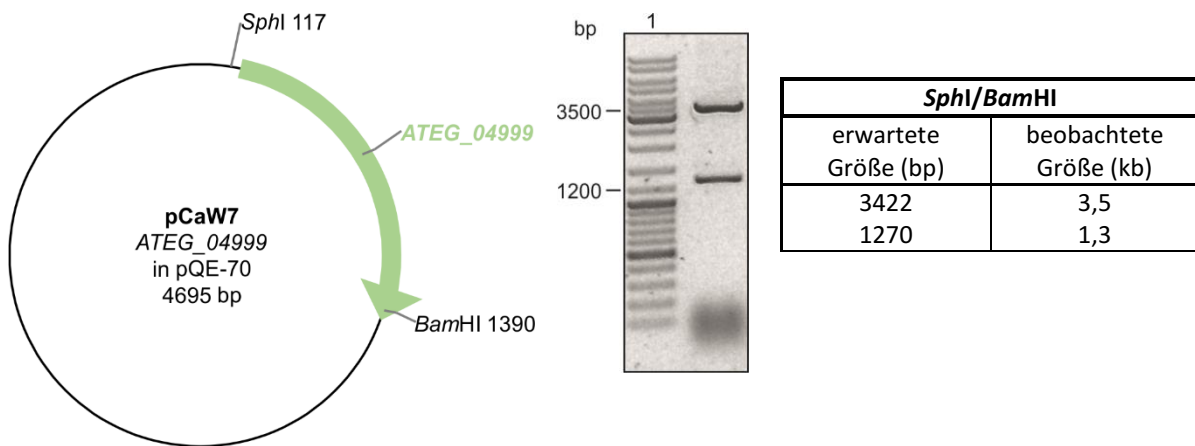
#### 4.1.3.3 Klonierung und Transformation

Das erzeugte PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und durch Hitzeschock in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines *SphI*/*Bam*HI-Doppelverdaus auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-16). Durch die Sequenzierung des Klonierungskonstrukts konnte die Basensequenz von *ATEG\_04999*, die vorhergesagte Intronsequenz und die gewünschte Mutation des Stopcodons im Konstrukt pCaW4 bestätigt werden. Lediglich eine Mutation auf Aminosäureebene von S<sub>230</sub> zu A<sub>230</sub> war zu verzeichnen. Diese Abweichung könnte während der PCR hervorgerufen worden sein oder sie deutet auf mögliche Sequenzunterschiede des verwendeten Stammes *A. terreus* DSM 1958 zum annotierten Stamm *A. terreus* NIH 2624 hin.



**Abb. 4-16: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW4 (*ATEG\_04999* in pGEM-T Easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

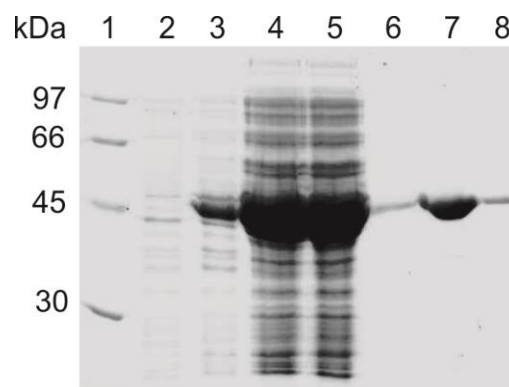
Das Plasmid pCaW16 wurde mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Bgl*II geschnitten und das 1340 bp DNA-Fragment in den Expressionsvektor pQE-70 überführt, der zuvor analog mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffnet wurde. Das erhaltene Expressionskonstrukt pCaW7 wurde mittels *Eco*RI/*Bam*HI-Verdau untersucht (Abb. 4-17).



**Abb. 4-17:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW7 (ATEG\_04999 in pQE-70) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

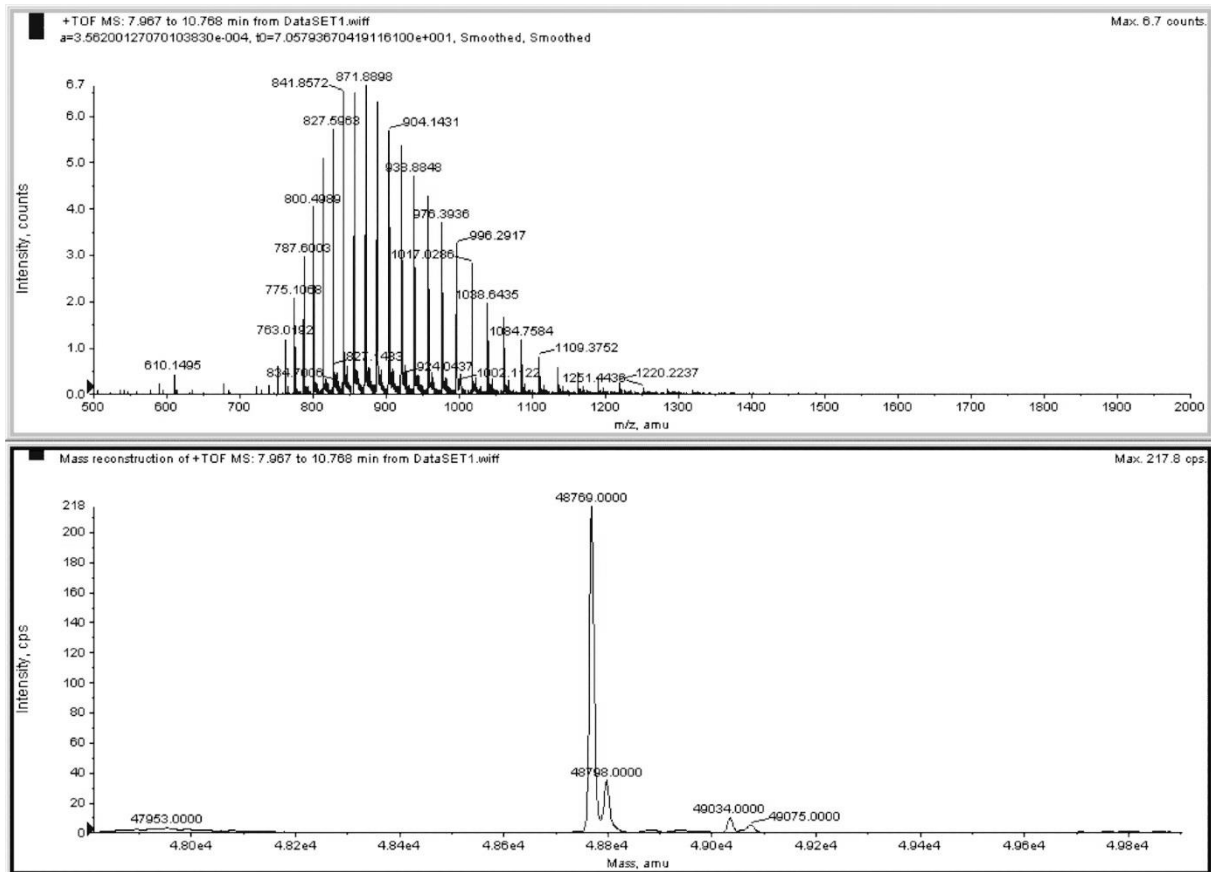
#### 4.1.3.4 Überproduktion und Aufreinigung von EAU34068-His<sub>6</sub>

Die heterologe Expression des Gens erfolgte in *E. coli* M15 Zellen. Die Induktion wurde unter Zugabe von 0,5 mM IPTG bei 37 °C für 6 h in LB-Medium durchgeführt. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnten 29 mg EAU34068-His<sub>6</sub> pro Liter Kultur erhalten werden. Zur Visualisierung erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4-18), welche das Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 48,7 kDa auf der Höhe von etwa 45 kDa aufzeigte.



**Abb. 4-18:** SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAU34068-His<sub>6</sub> (pCaW7) in *E. coli* M15 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach der Induktion, Spur 4: lösliche Proteinfraction nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion 1, Spur 8: Elutionsfraktion 2.

Aufgrund des unerwarteten Migrationsverhaltens von EAU34068-His<sub>6</sub> im SDS-Gel, welches auf eine falsche Größe schließen ließ, wurde das Protein hinsichtlich seiner tatsächlichen Masse mittels MALDI-TOF analysiert. Hierbei konnte jedoch die korrekte Masse von EAU34068-His<sub>6</sub> bestätigt werden. Das errechnete Molekulargewicht von 48770 Da wich vom tatsächlichen Molekulargewicht 48769 Da lediglich um 1 Da ab (Abb. 4-19). Demzufolge konnte das rekombinante Protein für weitere Arbeiten eingesetzt werden.



**Abb. 4-19: Ergebnisse der MALDI-TOF-Massenspektrometrie für EAU34068-His<sub>6</sub>.** Oben: Fragmentierungsmuster und Intensitäten der entstandenen Polypeptidketten, unten) Massenrekonstruktion des Proteins.

#### 4.1.3.5 Aktivitätstest mit EAU34068-His<sub>6</sub>

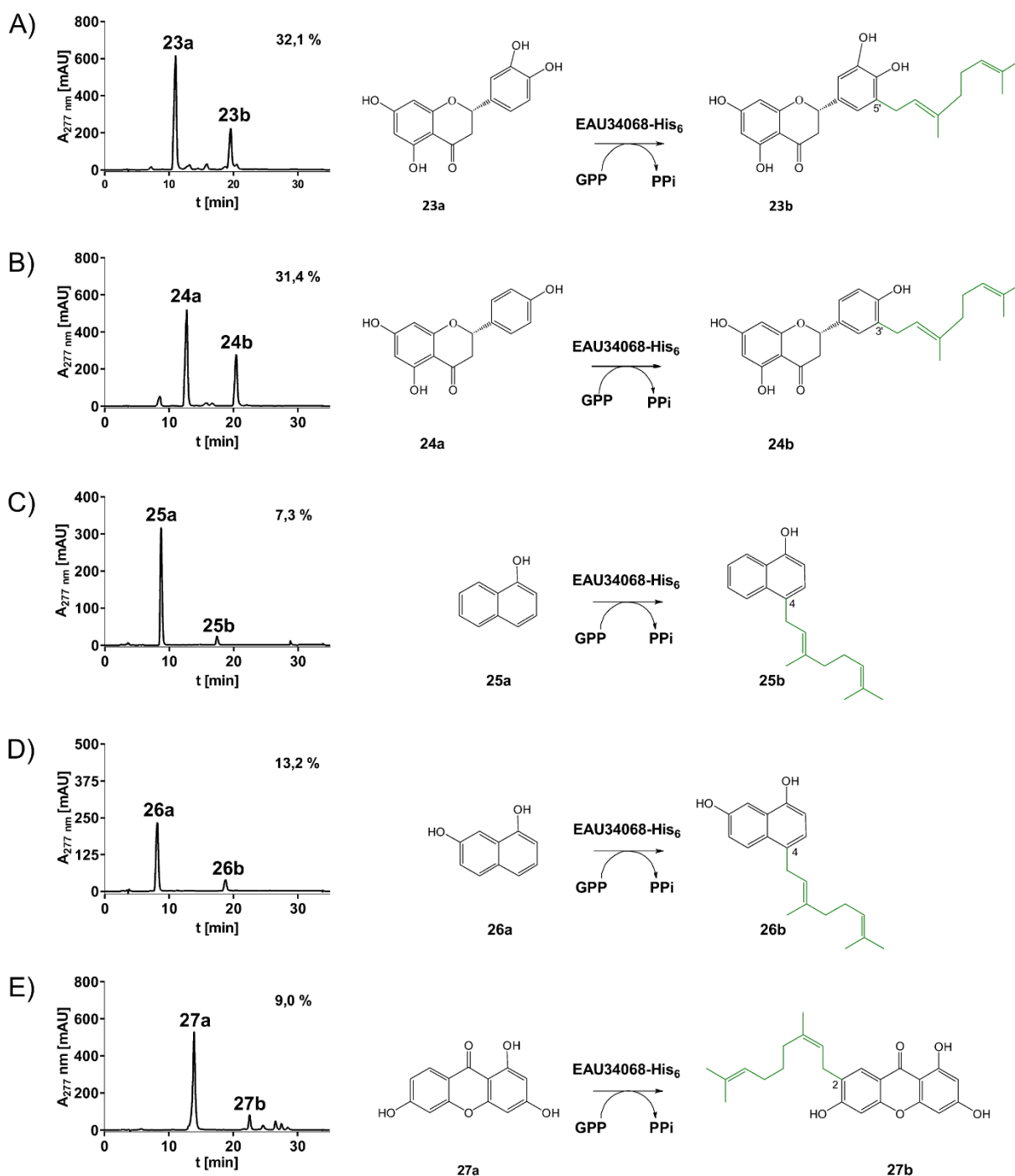
Im Fall von EAU34068-His<sub>6</sub> wurden aufgrund der hohen Sequenzidentitäten zu den Prenyltransferasen AnaPT und CTrpPT, die überwiegend die Prenylierung von zyklischen Dipeptiden katalysieren, die Akzeptanz tryptophanhaltiger zyklischer Dipeptiden in Gegenwart von 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM DMAPP in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C untersucht. Hierbei konnten leider keine Umsetzung erhalten werden. Unter Prüfung weiterer Substanzklassen (Tab. 4-7), wie Xanthonen, Hydroxynaphthalinen und Flavonoiden,

deren Akzeptanz bereits durch andere Mitglieder der DMATS-Superfamilie nachgewiesen werden konnte (Pockrandt *et al.*, 2012; Tarcz *et al.*, 2014b; Winkelblech & Li 2014; Yu *et al.*, 2011; Yu & Li 2011), sowie unter Verwendung von GPP als Prenyldonor (Pockrandt & Li 2013; Tarcz *et al.*, 2014b) konnte für einige Substrate eine Umsetzung beobachtet werden (Abb. 4-20).

**Tab. 4-7: Getestete Substrate in Verbindung mit EAU34068-His<sub>6</sub> und in Anwesenheit von DMAPP**

Substrat		Substrat	
<b>Aromatische Aminosäuren</b>	L-Trp		Luteolin-7-glucosid
	L-Tyr		Daidzein
<b>Naphthalin-derivate</b>	1-Naphthol		Morinhidrat
	2-Naphthol		6-Hydroxyflavanon
	1,2-Dihydroxynaphthalin		7-Hydroxyflavanon
	1,3-Dihydroxynaphthalin		Apegenin-7-O-glucosid
	1,4-Dihydroxynaphthalin		Fisetin
	1,5-Dihydroxynaphthalin		Spiraeosid
	1,6-Dihydroxynaphthalin		Callistephinchlorid
	1,7-Dihydroxynaphthalin		Cyanidinchlorid
	2,3-Dihydroxynaphthalin	<b>Xanthon-derivate</b>	8-Hydroxy-1,3-dimethylxanthon
	2,6-Dihydroxynaphthalin		1,3-Dihydroxyxanthon
	2,7-Dihydroxynaphthalin		1,3,6-Trihydroxyxanthon
	1,4-Dihydroxy-2-naphthoat		1,3,7-Trihydroxyxanthon
	3,5-Dihydroxy-2-naphthoat		1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon
	3,7-Dihydroxy-2-naphthoat		3-Hydroxy-9-xanthon
	5-Amino-1-naphthol		Xanthon
	8-Amino-2-naphthol		Xanthydrol
	5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon		2,8-Dihydroxy-3-methylxanthon
<b>Indolderivate</b>	L-β-Homotryptophan		2,8-Dihydroxy-1,3-dimethylxanthon
	Indol-3-propionsäure		2,8-Dihydroxy-1,3,4-trimethylxanthon
	Indol-3-pyruvat		1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon
	Indol-3-butyrat		1,7-Dihydroxy-6,8-dimethylxanthon
	L-Tryptamin		1,7-Dihydroxy-5,6,8-trimethylxanthon
	5-Methyl-DL-Trp	<b>Zyklische Dipeptide</b>	<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Trp
	7-Methyl-DL-Trp		<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Leu
	5-Hydroxy-L-Trp		<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Tyr
	Biochanin		<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Ala
<b>Flavonoide</b>	Hesperitin		<i>cyclo</i> -L-Trp-L-His
	Naringenin		<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Phe
	Genistein		<i>cyclo</i> -L-Trp-L-Pro
	Eriodictyol		<i>cyclo</i> -L-Trp-Gly
	Dihydroquercetin		(S)-Benzodiazepindion
	Chrysin		(R)-Benzodiazepindion
	Galangin		<i>cyclo</i> -L-Tyr-Ant
	Apegenin	<b>Andere mögliche Substrate</b>	Butyrolacton
	Hyperosid		ATP
	3,4-Dihydroxyflavon		Adenin
	Delphinidinchlorid		Guanin
	Keracyaninchlorid		3,7-Dimethyl-1,9-Dibenzofurandiol
	Kuromaninchlorid		Xanthin
	Pelargonidinchlorid		Paxilin

Hierbei konnten die Flavanone Eriodictyol (**23a**) und Naringenin (**24a**), die Hydroxynaphthaline 1-Naphthol (**25a**) und 1,7-Dihydroxynaphthalin (**26a**), sowie das Xanthon 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**) zu den Substraten gezählt werden. Der relative Umsatz lag hierbei zwischen 7,3 - 32,1 % (Abb. 4-20). Aufgrund der Prenylierung von Vertretern unterschiedlicher Substanzklassen zeigte EAU34068-His<sub>6</sub> eine breite Substratspezifität, einhergehend mit der Abnahme der Regioselektivität hinsichtlich der Prenylierungsposition.



**Abb. 4-20: Ausgewählte Substrate von EAU34068-His<sub>6</sub> mit dem jeweiligen Reaktionsschema.** A) Eriodictyol (**23a**), B) Naringenin (**24a**), C) 1-Naphthol (**25a**), D) 1,7-Dihydroxynaphthalin (**26a**) und E) 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**) (links) Substrat, (rechts) Produktbildung.

Es wird ersichtlich, dass EAU34068-His<sub>6</sub> Flavanone, wie Eriodictyol (**23a**) und Naringenin (**24a**) mit 32,1 % und 31,4 % Umsatz präferiert, während Substrate wie Hydroxynaphthaline (**25a**, **26a**) lediglich 22,7 – 41,1 % des Umsatzes von Eriodictyol (**23a**) erreichen. Bei 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**) beträgt die Ausbeute nur 9 %, also 28,0 % der Ausbeute mit Eriodictyol (**23a**). Demzufolge zeigt EAU34068-His<sub>6</sub> eine breite Substratspezifität, jedoch mit unterschiedlicher Substratpräferenz zu den einzelnen Substratgruppen.

#### 4.1.3.6 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte mit EAU34068-His<sub>6</sub>

Für die fünf Substrate konnten aufgrund der relativ hohen Umsätze ausreichende Mengen der enzymatischen Produkte zur Strukturaufklärung isoliert werden (**23b** – **27b**). Jeweils 20 ml Reaktionsansätze (Kapitel 3.7.7.3) wurden angesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung des jeweiligen Produktes erfolgte mittels HPLC und die Strukturen der Produkte wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR (Tab. 4-8) aufgeklärt. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Produkte befinden sich im Anhang (Kapitel 7.4: Abb. 7-37 - Abb. 7-41). Der Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der enzymatischen Produkte (**23b** – **27b**) mit den entsprechenden Spektren der Substrate (Daten nicht gezeigt) zeigte eindeutig das Vorhandensein von Signalen eines Prenylrestes. Im Fall der Produkte von **23b** – **27b** handelte es sich um eine Geranylierung bei  $\delta_{\text{H}}$  3,31 – 3,65 (d, H-1''), 5,32 – 5,34 (t, H-2''), 2,11 – 2,13 (m, H-4''), 2,04 – 2,10 (m, H-5''), 5,07 – 5,11 (t sept, H-6''), 1,71 – 1,80 (s, H-8''), 1,62 – 1,69 (s, H-9''), 1,57 – 1,60 (m, H-10''). Die chemische Verschiebung von H-1' sprach für eine Prenylierung eines aromatischen C-Atoms (Pockrandt *et al.*, 2014; Winkelblech & Li 2014; Yu *et al.*, 2011; Yu & Li 2011). Im Fall der prenylierten Hydroxynaphthaline (**25b**, **26b**) konnte zudem das Fehlen des H-4 Protons am Naphthalin bestätigt werden, welches durch das entsprechende Kopplungsmuster in diesem Bereich abgeleitet werden konnte. Zur zweifelsfreien Identifizierung wurde das Kopplungsmuster der verbliebenen Protonen außerdem mit anderen prenylierten Derivaten verglichen (Yu *et al.*, 2011) und die Geranylierung an Position C4 bestätigt. Die erhaltenen spektroskopischen Daten der Produkte **23b** und **24b** konnten ebenfalls durch den Vergleich mit prenylierten Varianten folgerichtig zugeordnet werden (Yu & Li 2011). Die Geranylierung erfolgte bei Eriodictyol (**23a**) an Position C5' und bei Naringenin (**24a**) an Position C3' des Ring B der beiden Flavanon-Grundgerüsts. Durch den Vergleich der Kopplungsmuster zwischen dem Produkt **27b** und dem zugehörigen Substrat 1,3,6-Trihydroxyxanthon (Ling 2013) konnte die Prenylierung an Position C2 identifiziert werden.

Tab. 4-8: <sup>1</sup>H-NMR-Daten der enzymatischen Produkte von EAU34068-His6

Substanz						
	<sup>1</sup> H-NMR-Daten in CD <sub>3</sub> OD von C5'-prenyliertem Eriodictyol ( <b>23a</b> )	<sup>1</sup> H-NMR-Daten in CD <sub>3</sub> OD von C3'-prenyliertem Naringenin ( <b>24b</b> )	<sup>1</sup> H-NMR-Daten in CD <sub>3</sub> OD von 1-Naphthol ( <b>25b</b> )	<sup>1</sup> H-NMR-Daten in CD <sub>3</sub> OD von C4'-prenyliertem 1-Naphthol ( <b>25b</b> )	<sup>1</sup> H-NMR-Daten in CD <sub>3</sub> OD von 1,7-Dihydroxynaphthalin ( <b>26b</b> )	<sup>1</sup> H-NMR-Daten in CDCl <sub>3</sub> von C2-prenyliertem 1,3,6 – Trihydroxyxanthon ( <b>27b</b> )
Pos.	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]	δ <sub>H</sub> , multi., J [Hz]
OH-8	-	-	-	-	-	13,09; s
1	-	-	-	-	-	7,97; s
2	5,25; dd; 12,5; 3,1	5,31; dd; 12,7; 3,1	6,72; d; 7,7	6,72; d; 7,7	6,64; d; 7,6	-
3a	3,04; dd; 17,1; 12,5	3,09; dd; 17,2; 12,7	7,10; d; 7,7	7,10; d; 7,7	6,89; d; 7,6	-
3b	2,69; dd; 17,1; 3,1	2,69; dd; 17,2; 3,1	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	6,81; s
5	-	-	-	-	-	6,34; d; 2,0
6	5,89; d; 2,2 <sup>a</sup>	5,89; d; 2,2 <sup>a</sup>	7,90; ddd; 8,4; 1,4; 0,7	7,90; ddd; 8,4; 1,4; 0,7	7,77; d; 9,0	-
7	-	-	7,46; ddd; 8,4; 6,8; 1,4	7,46; ddd; 8,4; 6,8; 1,4	7,04; dd; 9,0; 2,7	-
8	5,87; d; 2,2 <sup>a</sup>	5,87; d; 2,2 <sup>a</sup>	7,40; ddd; 8,1; 6,8; 1,4	7,40; ddd; 8,1; 6,8; 1,4	-	6,25; d; 2,0
9	-	-	8,21; ddd; 8,4; 1,4; 0,7	8,21; ddd; 8,4; 1,4; 0,7	7,49; d; 2,6	-
10	-	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-	-
2'	6,77; d; 2,0	7,17; d; 2,1	-	-	-	-
4'	-	-	-	-	-	-
5'	-	6,78; d; 8,3	-	-	-	-
6'	6,68; d; 2,0	7,13; dd; 8,2; 2,3	-	-	-	-
8'	-	-	-	-	-	-
9'	-	-	-	-	-	-
10'	-	-	-	-	-	-
1''	3,31*	3,31*	3,65; d; 6,9	3,65; d; 6,9	--	3,47; d; 7,1
2''	5,33; td; 7,4; 1,2	5,34; td; 7,3; 1,3	5,33 t sept; 6,9; 1,2	5,33 t sept; 6,9; 1,2	3,60; d; 6,8	5,34; t; 7,1
4''	2,11; m	2,12; m	2,11; m	2,11; m	2,12; m	2,13; m
5''	2,04; m	2,05; m	2,06; m	2,06; m	2,05; m	2,10; m
6''	5,10; t sept; 7,0; 1,4	5,11; t sept; 7,0; 1,4	5,08; t sept; 7,0; 1,4	5,08; t sept; 7,0; 1,4	5,08; t; 6,9	5,07; t; 6,5
8''	1,71; s	1,71; s	1,79; d; 1,2	1,79; d; 1,2	1,77; s	1,80; s
9''	1,62; s	1,62; s	1,62; d; 1,2	1,62; d; 1,2	1,63; s	1,69; s
10''	1,57; s	1,57; s	1,57; d; 0,8	1,57; d; 0,8	1,57; s	1,60; s

Spektrometer: JEOL ECA-500. Chemische Verschiebung (δ) sind in ppm und Kopplungskonstanten in Hz angegeben. \* überlappende Signale mit dem Lösungsmittel.

<sup>a</sup> Zuordnung ist austauschbar.



#### 4.1.3.7 Biochemische Eigenschaften von EAU34068-His<sub>6</sub> und Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Produktbildung bei einem 100 µl Reaktionsansatz befindet sich mit 20 µg EAU34068-His<sub>6</sub> und 120 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abb. 4-21).

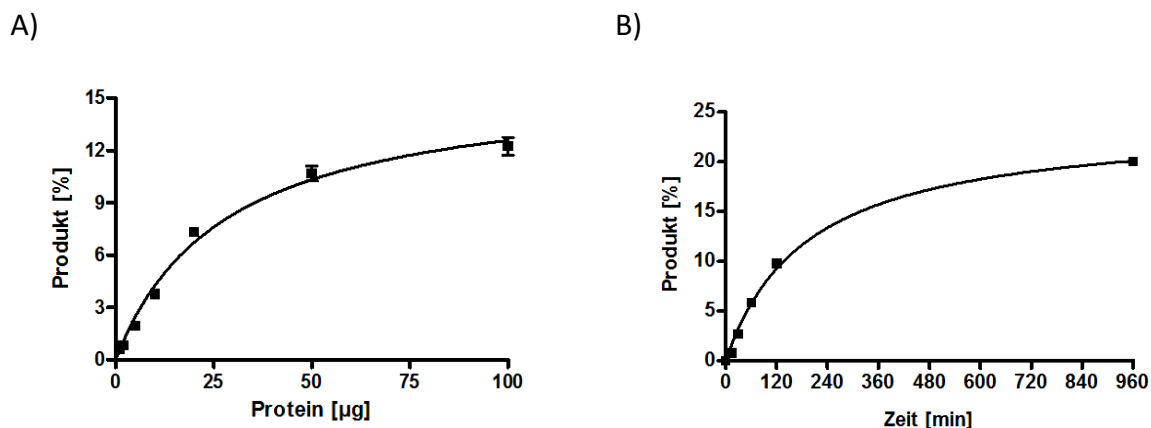
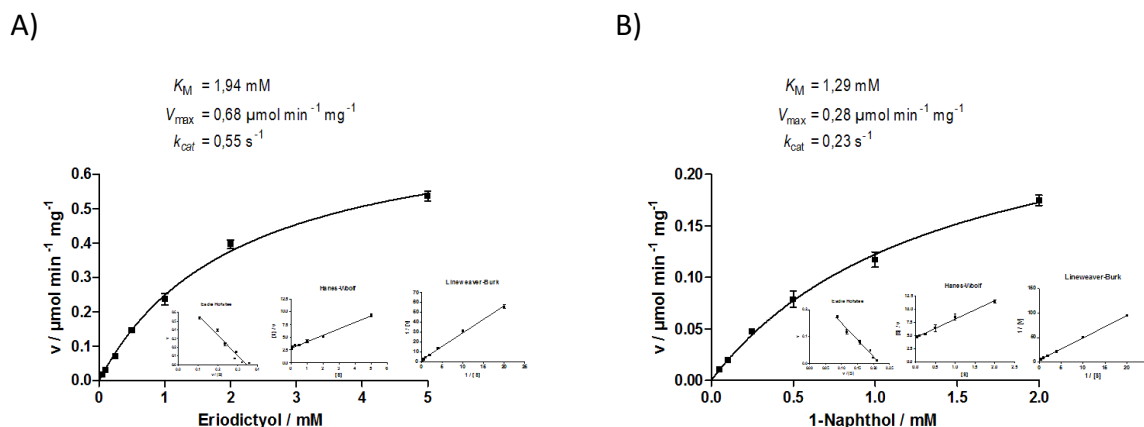


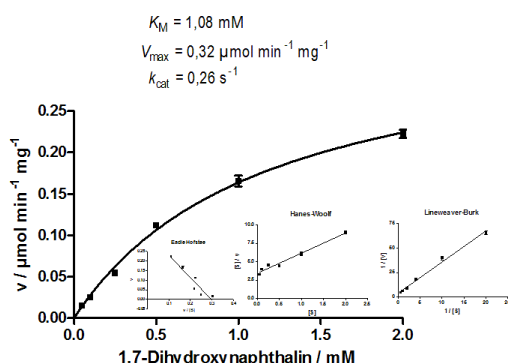
Abb. 4-21: Abhängigkeit der Produktbildung der EAU34068-His<sub>6</sub>-Reaktion mit 23a von A) der Proteinmenge und B) der Inkubationszeit.

Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten 1 mM Eriodictyol (**23a**), 2 mM GPP, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und A) unterschiedliche Mengen EAU34068-His<sub>6</sub> mit einer Inkubationszeit von 60 min bzw. B) 20 µg EAU34068-His<sub>6</sub> mit variierenden Inkubationszeiten.

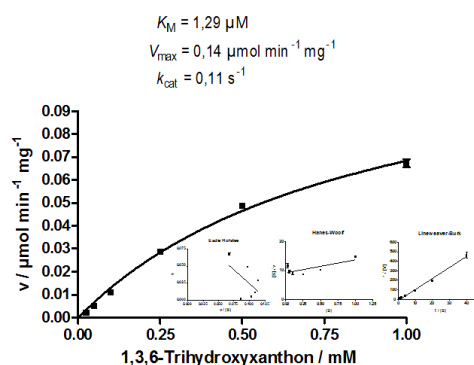
Da es sich um ein Kooperationsprojekt handelte, wurden nach Absprache die Untersuchung zur Abhängigkeit gegenüber 4 ausgewählter Substrate Eriodictyol (**23a**), 1-Naphthol (**25a**), 1,7-Dihydroxynaphthalin (**26a**) und 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**) durchgeführt. Hierbei wurden sowohl die Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_M$ ), als auch die Wechselzahlen ( $k_{cat}$ ) anhand der Eadie-Hofstee-, Hanes-Woolf- und Lineweaver-Burk-Transformationen bestimmt. Dabei folgten, die von EAU34068-His<sub>6</sub> katalysierten Reaktionen offenbar der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 4-22).



C)



D)



**Abb. 4-22: Bestimmung der kinetischen Parameter der von EAU34068-His<sub>6</sub> katalysierten Reaktionen. A) Eriodictyol, B) 1-Naphthol, C) 1,7-Dihydroxynaphthalin, D) 1,3,6-Trihydroxyxanthon.**

In Tab. 4-9 sind die ermittelten kinetischen Parameter zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 4-9: Kinetische Parameter von EAU34068-His<sub>6</sub>**

Substrate	$K_M$ [mM]	$V_{\max}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [%]
Eriodictyol ( <b>23a</b> )	1,94	0,68	0,55	284,2	100,0
1-Naphthol ( <b>25a</b> )	1,28	0,28	0,23	176,8	62,2
1,7-Dihydroxynaphthalin ( <b>26a</b> )	1,08	0,32	0,26	241,9	85,1
1,3,6 Trihydroxyxanthon ( <b>27a</b> )	1,29	0,14	0,11	87,0	30,6

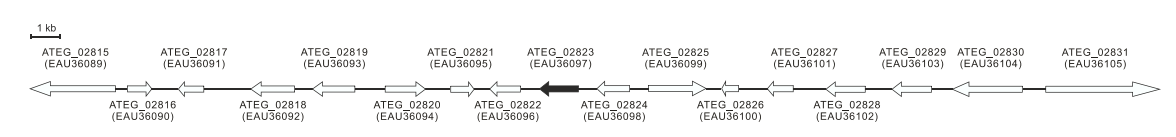
EAU34068-His<sub>6</sub> zeigte bei den getesteten Substraten hohe  $K_M$ -Werte zwischen 1,08 mM (**26a**) und 1,94 mM (**23a**), jedoch im Fall von Eriodictyol (**23a**) trotz des höchsten  $K_M$ -Wertes auch eine deutlich höhere Wechselzahl  $0,55 \text{ s}^{-1}$ . Dieses Phänomen konnte auch bei anderen Prenyltransferasen, wie XptB oder AuaA (Pockrandt *et al.*, 2012; Stec *et al.*, 2011) bereits beobachtet werden. Demzufolge ist beziehungsweise auf Eriodictyol (**23a**) die katalytische Effizienz dennoch am größten, gefolgt von den Hydroxynaphthalinen (**25a**, **26a**) und abschließend 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**), bei dem die relative katalytische Effizienz lediglich 30,6 % vergleichend zu Eriodictyol (**23a**) beträgt.

#### 4.1.4 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU36097 aus *A. terreus* DSM 1958

##### 4.1.4.1 Einleitung

Das putative Prenyltransferasegen *ATEG\_02823* befindet sich auf dem Supercontig 4 von *A. terreus* NIH 2624 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NT\_165927.1). Die durch NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorhergesagte Größe beträgt 1326 bp (121853 bp - 123178 bp), welches ein abgeleitetes Genprodukt EAU36097 von 424 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 46,7 kDa besitzt. EAU36097 zeigt niedrige Homologie zu bereits charakterisierten Prenyltransferasen auf. Aufgrund von Alignmentanalysen können jedoch Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene zu anderen Prenyltransferasen der DMTS-Superfamilie nachgewiesen werden. Insbesondere zu Vertretern, die überwiegend für die Akzeptanz von tryptophan-haltigen zyklische Dipeptiden bekannt sind, wie BrePT (Yin *et al.*, 2013a) mit 34 %, AnaPT aus *N. fischeri* (Yin *et al.*, 2009b) mit 33% oder auch CdpC2PT aus *N. fischeri* (Mundt & Li 2013) mit 32 % und CTrpPT aus *A. oryzae* (Zou *et al.*, 2010) mit 31 %. Die Analyse von *ATEG\_02823* und benachbarter Gene (Tab. 4-10) deutete auf eine mögliche Zugehörigkeit zu Biosynthese-Genclustern hin.

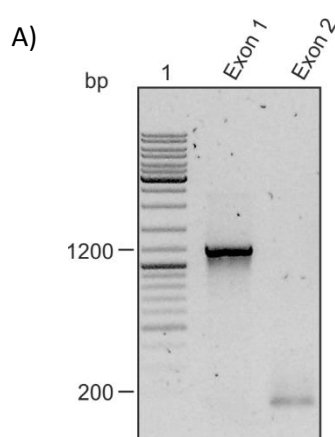
**Tab. 4-10: genetischer Kontext von *ATEG\_02823* auf dem Supercontig 4 (NT\_165927.1)**

				
Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>ATEG_02815</i>	EAU36089	937	104608-107521	NRPS-like Enzym
<i>ATEG_02816</i>	EAU36090	254	107905-108736	Methyltransferase
<i>ATEG_02817</i>	EAU36091	164	109630-110498	Carboanhydrase
<i>ATEG_02818</i>	EAU36092	428	112088-113579	O-Methyltransferase
<i>ATEG_02819</i>	EAU36093	481	114179-115624	Aminotransferase/Decarboxylase
<i>ATEG_02820</i>	EAU36094	414	116634-118007	Cytochrom P450
<i>ATEG_02821</i>	EAU36095	265	118857-119654	Dehydrogenase
<i>ATEG_02822</i>	EAU36096	312	120173-121219	Unbekanntes Protein
<b><i>ATEG_02823</i></b>	<b>EAU36097</b>	<b>421</b>	<b>121853-123178</b>	<b>Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie</b>
<i>ATEG_02824</i>	EAU36098	370	123796-124908	NADH:Flavin-Oxidoreduktase/NADH-Oxidase
<i>ATEG_02825</i>	EAU36099	482	125541-127502	Cytochrom P450
<i>ATEG_02826</i>	EAU36100	139	128010-128581	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_02827</i>	EAU36101	293	129550-130431	Methyltransferase
<i>ATEG_02828</i>	EAU36102	390	131536-132878	Cytochrom P450
<i>ATEG_02829</i>	EAU36103	448	133767-135113	Salicylsäuresynthase
<i>ATEG_02830</i>	EAU36104	744	135821-138207	Monooxygenase
<i>ATEG_02831</i>	EAU36105	1294	138981-142865	NRPS

Anhand der erhaltenen Angaben und der Nähe zum NRPS-like Gen *ATEG\_02815* (*btyA*) wird für *ATEG\_02823* (EAU36097) eine mögliche Funktion in der Biosynthese von Butyrolacton I und III postuliert (Guo *et al.*, 2013). Aufgrund der Nähe zu einem weiteren NRPS-Gen *ATEG\_02831* (EAU36105), dessen Produkt bis dato nicht identifiziert werden konnte, könnte EAU36097 außerdem bei der Biosynthese eines weiteren Sekundärmetaboliten eine Rolle spielen.

#### 4.1.4.2 Amplifikation von *ATEG\_02823* aus genomischer DNA von *A. terreus* DSM 1958

Das Gen *ATEG\_02823* setzt sich zusammen aus 2 Exons zu 1127 und 139 bp, welche durch ein Intron von 60 bp unterbrochen sind. Die einzelnen Exons wurden durch Fusions-PCR (Kapitel 3.6.4) in einer ersten PCR-Runde separat amplifiziert und anschließend in einer 2. PCR-Runde fusioniert. Hierbei wurde auf das High Fidelity PCR-Kit (Roche) zurückgegriffen. Die Amplifikation des 1. Exons erfolgte durch die Primerkombination CaW\_02823-1/ CaW\_02823-3 (Abb. 4-23; A: Exon 1) und für das 2. Exon wurden die Primer CaW\_02823-2/ CaW\_02823-4 (Abb. 4-23; A: Exon 2) verwendet (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6). Der Primer CaW\_02823-4 vermittelt hierbei gleichzeitig eine Mutation im Stopcodon von *ATEG\_02823* um den Leserahmen insoweit zu erweitern, dass das Genprodukt um einen vektorkodierten Histidin-tag zur Aufreinigung ergänzt wird. Für die Fusion beider Exons wurde jeweils das PCR-Produkt 1 und das PCR-Produkt 2 als Matrize in Verbindung mit den flankierenden Primern CaW\_02823-1 und CaW\_02823-4 eingesetzt (Abb. 4-23; B: Fusion).



Exon 1	94 °C	94 °C	59 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	1,5 min	5 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

Exon 2	94 °C	94 °C	59 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	1 min	5 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

Fusion	94 °C	94 °C	59 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	2 min	5 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

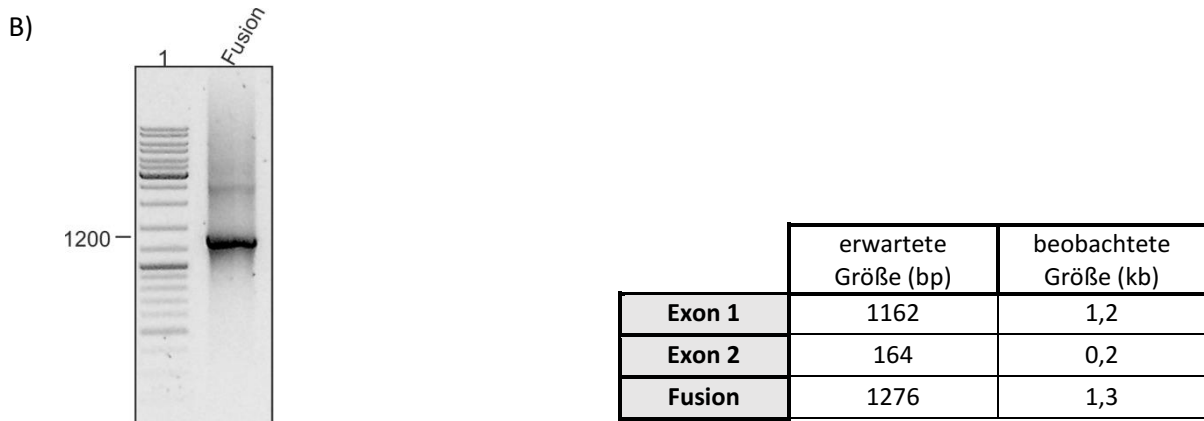


Abb. 4-23: Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *ATEG\_02823* aus genomischer DNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2. Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

#### 4.1.4.3 Klonierung und Transformation

Das erzeugte PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue MRF' eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch einen *SphI*/*Bam*HI-Doppelverdau auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-24). Durch die Sequenzierung des Klonierungskonstrukts konnte die fehlerfreie Basensequenz von *ATEG\_02823*, die Intron-Vorhersage und die gewünschte Mutation des Stopcodons im Konstrukt pCaW5 bestätigt werden.

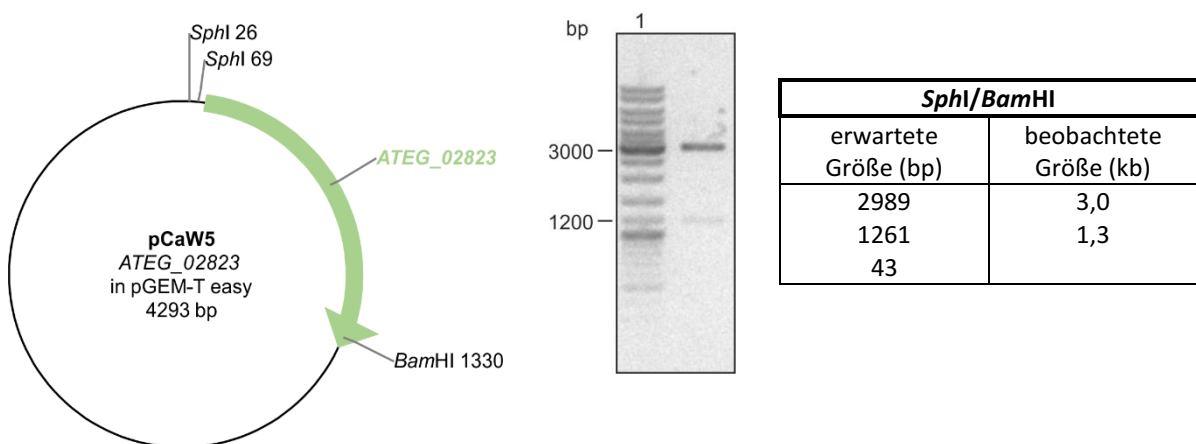
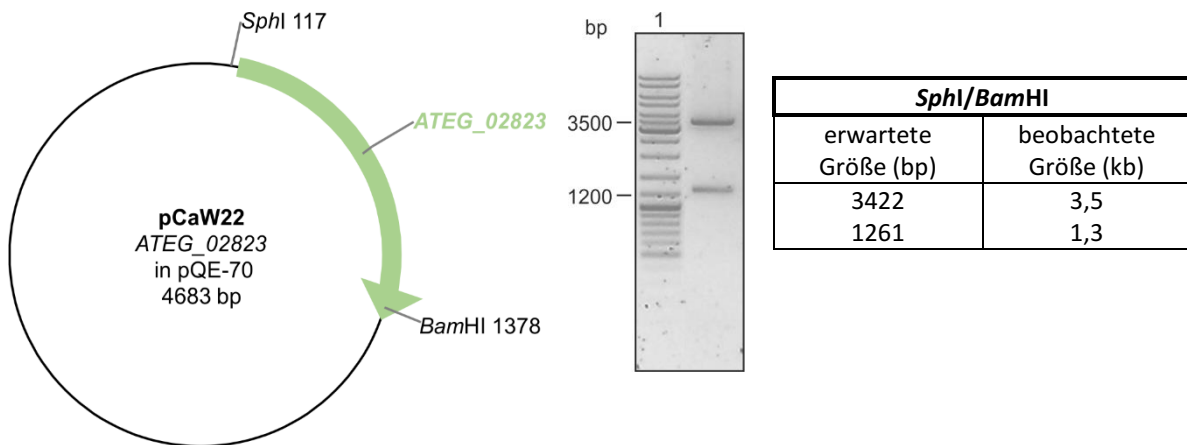


Abb. 4-24: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW5 (*ATEG\_02823* in pGEM-T Easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

Das Plasmid pCaW5 wurde mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *Bam*HI geschnitten und das 1276 bp DNA-Fragment in den ebenso vorbereiteten Expressionsvektor pQE-70 überführt. Das

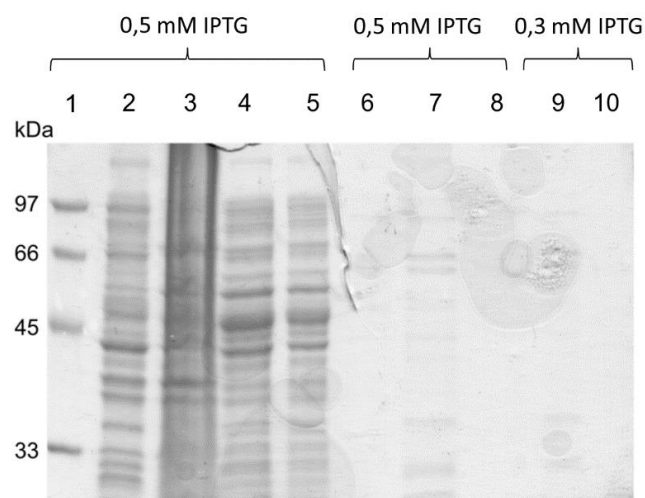
erhaltene Expressionskonstrukt pCaW22 wurde unter Verwendung derselben Restriktionsenzyme analysiert (Abb. 4-25).



**Abb. 4-25:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW22 (ATEG\_02823 in pQE-70) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

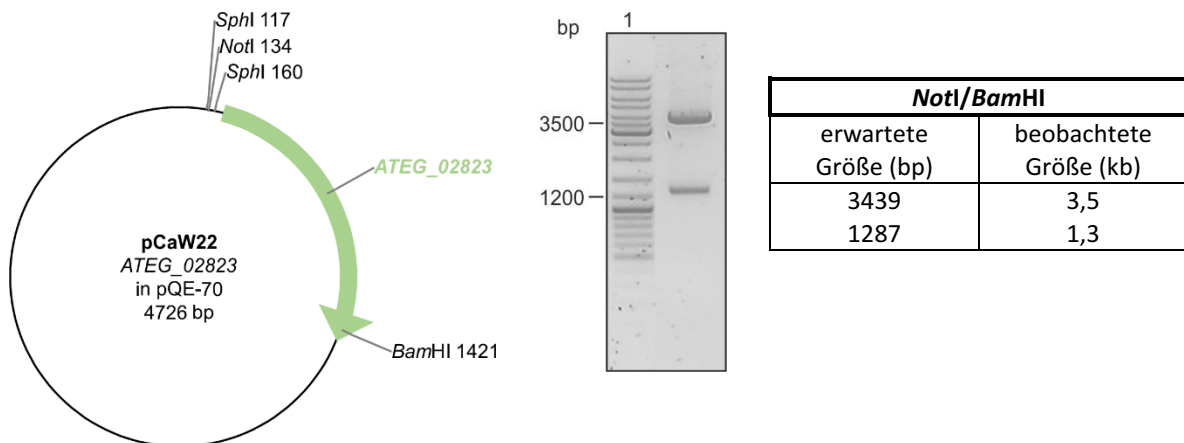
#### 4.1.4.4 Überproduktion und Aufreinigung von EAU36097-His<sub>6</sub>

Die heterologe Expression des Gens erfolgte in *E. coli* M15 Zellen. Die Induktion wurde unter Zugabe von 0,5 und 0,3 mM IPTG bei 37 °C für 16 h in LB-Medium durchgeführt. Nach der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnte nach durchgeführter SDS-Gelelektrophorese leider kein Protein erhalten werden (Abb. 4-26). Das Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 47,7 kDa konnte nicht nachgewiesen werden. Auch eine Bande in der Fraktion nach der Induktion konnte nicht detektiert werden.



**Abb. 4-26:** SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAU36097-His<sub>6</sub> (pCaW22) in *E. coli* M15 Zellen. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach der Induktion, Spur 4: lösliche Proteinfraction nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7/9: Elutionsfraktion, Spur 8/10: umgepufferte Elutionsfraktion.

Aus diesem Grund wurde das Konstrukt pCaW22 einem weiteren Kontrollverdau mittels *NotI* und *BamHI* unterzogen. Hierbei kann über die *NotI*-Schnittstelle festgestellt werden, ob eventuell ein zu großes Fragment aus pCaW5 umkloniert wurde. Dieser Umstand hätte die Verschiebung des Leserahmens zur Folge und damit auch den Abbruch der Proteinbiosynthese von EAU36097-His<sub>6</sub> (Abb. 4-27).



**Abb. 4-27:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW22 (*ATEG\_02823* in pQE-70) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung und Umklonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Leider wurde die fehlerhafte Umklonierung bestätigt und das Expressionskonstrukt pCaW22 verworfen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten die Arbeiten zu dieser Prenyltransferase noch nicht abgeschlossen werden.


#### 4.1.5 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU33872 aus *A. terreus* DSM 1958

##### 4.1.5.1 Einleitung

Das vermeintliche Prenyltransferasegen *ATEG\_06111* ist auf dem Supercontig 8 von *A. terreus* NIH 2624 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NT\_165931.1) vorzufinden. Laut NCBI-Annotation (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) umfasst es eine Größe von 1031 bp (1343950 bp – 1344980 bp). Das zugehörige Genprodukt umfasst hierbei lediglich 324 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 35,8 kDa. EAU33872 zeigt laut Sequenzanalysen Ähnlichkeiten zu zyklischen Dipeptid-akzeptierenden Prenyltransferasen, hierbei insbesondere zur C3-Prenyltransferase AnaPT aus *N. fischeri* (Yin *et al.*, 2009b) mit Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene von 36 % oder zur C7-Prenyltransferase CdpC7PT

ebenfalls aus *A. terreus* (Wunsch *et al.*, 2014) von 29 %. Entsprechende relative Identitäten bestehen aber auch zur Tryptophan-akzeptierenden Prenyltransferase MaPT aus *M. aurantiaca* (Ding *et al.*, 2008). Die Analyse des genetischen Umfeldes von *ATEG\_06111* (Tab. 4-11) zeigte die mögliche Zugehörigkeit zu einem Sekundärmetabolit-Gencluster auf.

**Tab. 4-11: genetischer Kontext von *ATEG\_06111* auf dem Supercontig 8 (NT\_165931.1)**

				
Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>ATEG_06106</i>	EAU33867	1224	1329616-1333685	CorA-ähnlicher Mg <sup>2+</sup> -Transporter
<i>ATEG_06107</i>	EAU33868	485	1334779-1336627	Glykosidase
<i>ATEG_06108</i>	EAU33869	517	1337446-1339081	Carboxylesterase
<i>ATEG_06109</i>	EAU33870	270	1339817-1340720	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_06110</i>	EAU33871	82	1342219-1342467	Unbekanntes Protein
<b><i>ATEG_06111</i></b>	<b>EAU33872</b>	<b>324</b>	<b>1343950-1344980</b>	<b>Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie</b>
<i>ATEG_06112</i>	EAU33873	403	1347450-1348763	Monooxygenase
<i>ATEG_06113</i>	EAU33874	2345	1349909-1357542	NRPS
<i>ATEG_06114</i>	EAU33875	101	1358045-1358461	Mikrotubuli-Bindekomplex
<i>ATEG_06115</i>	EAU33876	283	1359051-1360028	Rho-GTPase
<i>ATEG_06116</i>	EAU33877	525	1361466-1363328	Phosphatidat-Phosphatasen

Beim Genprodukt von *ATEG\_06113* handelt es sich um eine bimodulare NRPS (EAU33874), wobei das erste Modul nicht über eine intakte oder strukturell ungewöhnliche Adenylierungsdomäne verfügt. Aussergewöhnlich ist hier auch das Auftreten von zwei aufeinanderfolgenden Kondensationsdomänen innerhalb dieses Moduls. Demzufolge können bisher keine Aussagen über die Struktur dieses Produktes, welches durch EAU33872 und EAU33873 weiter modifiziert werden könnte, getroffen werden.

#### 4.1.5.2 Amplifikation von *ATEG\_06111* aus genomischer DNA von *A. terreus* DSM 1958

Strukturell ist das Gen *ATEG\_06111* aus 2 Exons zu 851 und 124 bp aufgebaut, welche durch ein Intron von 56 bp unterbrochen sind. Die einzelnen Exons wurden durch Fusions-PCR (Kapitel 3.6.4) in einer ersten PCR-Runde separat amplifiziert und anschließend in einer 2. PCR-Runde vereinigt. Hierbei wurde auf das High Fidelity PCR-Kit (Roche) zurückgegriffen. Die Amplifikation des 1. Exons erfolgte durch die Primerkombination CaW\_06111-1/ CaW\_06111-



3 (Abb. 4-28; A: Exon 1) und für das 2. Exon wurden die Primer CaW\_06111-2/ CaW\_06111-4 (Abb. 4-28; A: Exon 2) verwendet (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6). Der Primer CaW\_06111-4 vermittelt hierbei gleichzeitig eine Mutation im Stopcodon von *ATEG\_06111* zur Erweiterung des Genproduktes um einen zur Aufreinigung implementierten Histidin-*tag*. Für die Fusion beider Exons wurde jeweils das PCR-Produkt 1 und das PCR-Produkt 2 als Vorlage mit den flankierenden Primer CaW\_06111-1 und CaW\_06111-4 verwendet (Abb. 4-28; B: Fusion).

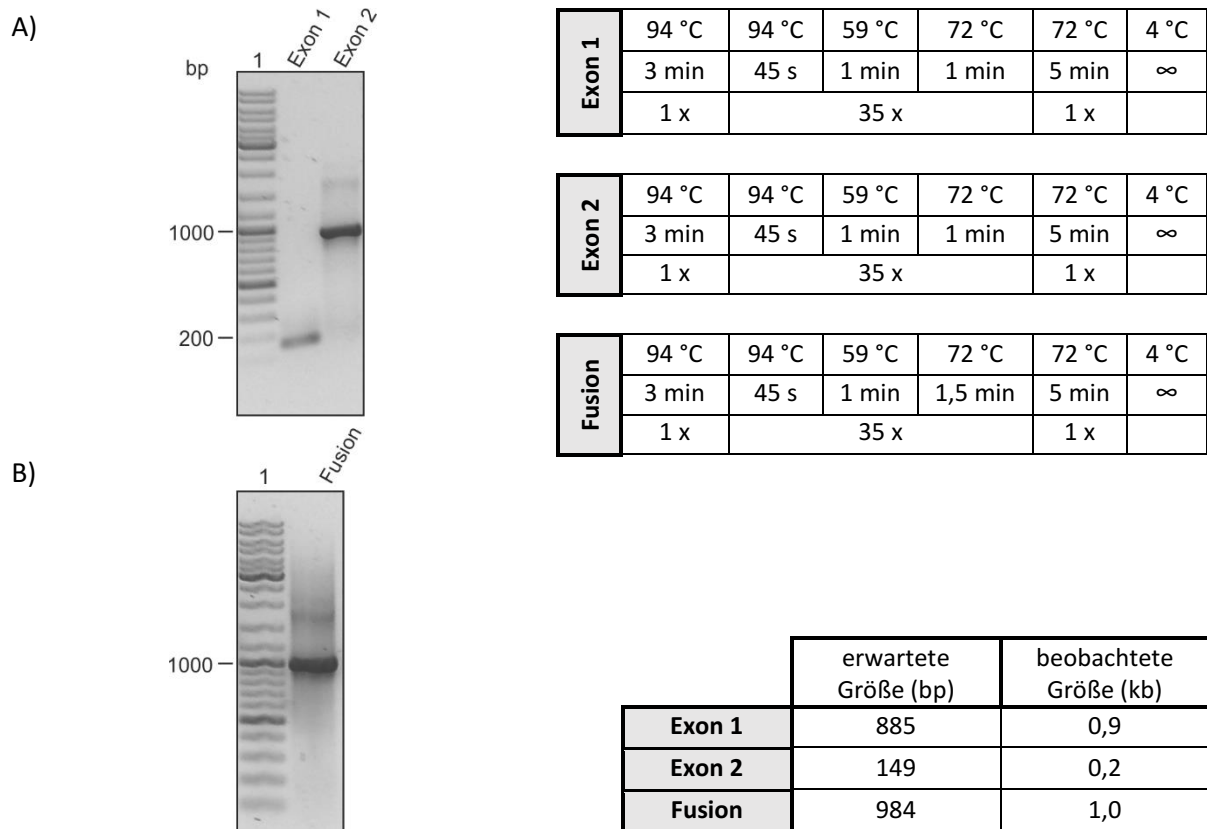
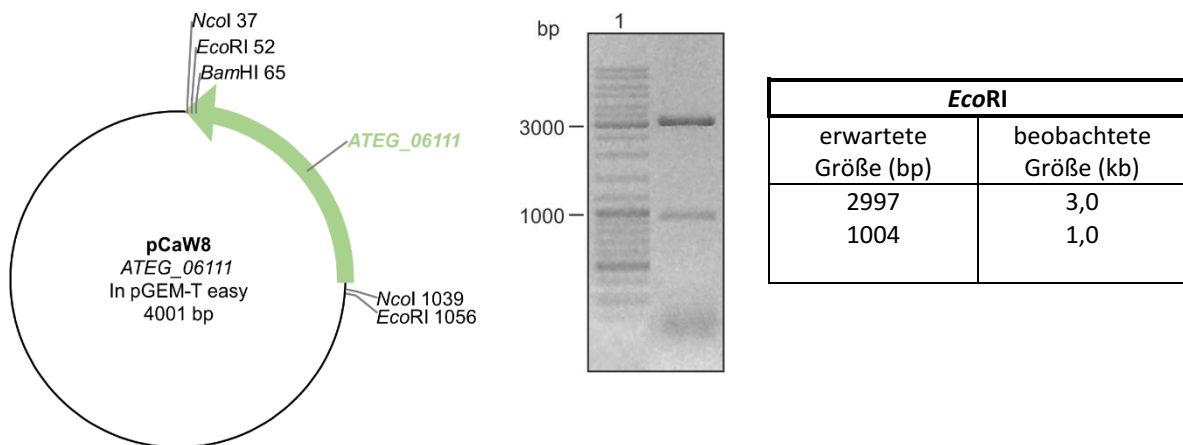


Abb. 4-28: Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *ATEG\_06111* aus genomischer DNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2. Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

#### 4.1.5.3 Klonierung und Transformation

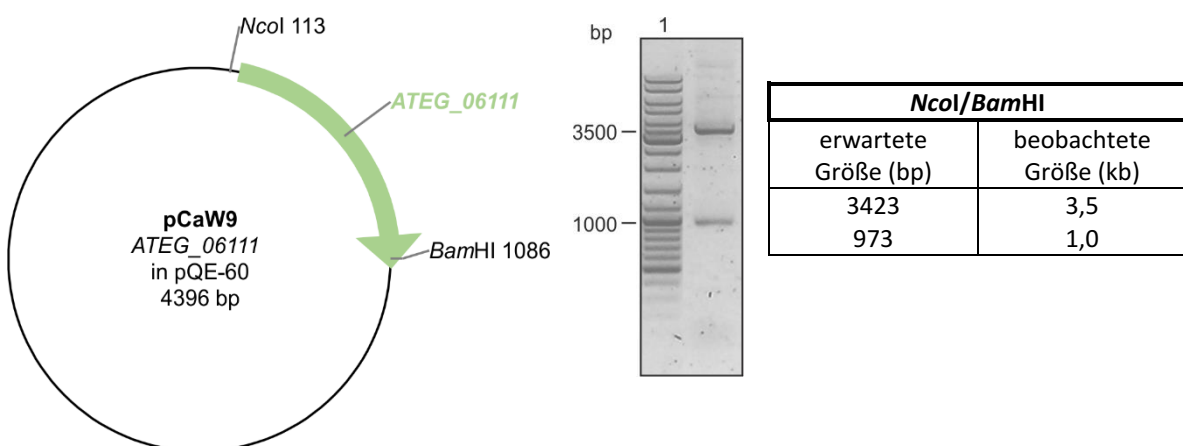
Das erzeugte PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue MRF' eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch einen *EcoRI*-Verdau auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-29). Durch die Sequenzierung des Klonierungskonstruktes konnte die Basensequenz von *ATEG\_06111*, die Intron-Vorhersage und die gewünschte Mutation des Stopcodons im

Konstrukt pCaW8 bestätigt werden. Lediglich 2 weitere Mutationen waren zu beobachten, welche im putativen Genprodukt die Aminosäuren von S<sub>2</sub> zu G<sub>2</sub> und T<sub>31</sub> zu N<sub>31</sub> veränderten. Diese Mutationen können ihrerseits während der PCR hervorgerufen worden sein oder sie weisen auf mögliche Sequenzunterschiede des verwendeten Stammes *A. terreus* DSM 1958 zum annotierten Stamm *A. terreus* NIH 2624 hin.



**Abb. 4-29: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW8 (ATEG\_06111 in pGEM-T Easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

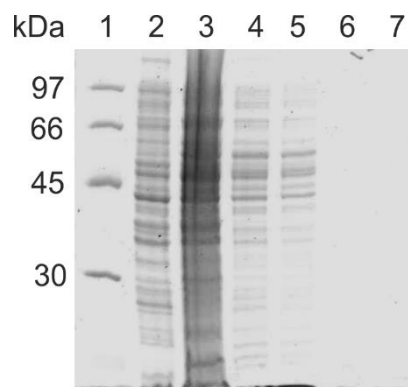
Das Plasmid pCaW8 wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* geschnitten und das 973 bp DNA-Fragment in den gleichermaßen vorbereiteten Expressionsvektor pQE-60 überführt. Das erhaltene Expressionskonstrukt pCaW9 konnte unter Verwendung derselben Restriktionsenzyme verifiziert werden (Abb. 4-30).



**Abb. 4-30: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW9 (ATEG\_06111 in pQE-60) und die zugehörige Vektorkarte.** Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

#### 4.1.5.4 Überproduktion und Aufreinigung von EAU33872-His<sub>6</sub>

Die heterologe Expression des Gens erfolgte in *E. coli* M15 Zellen. Die Induktion wurde unter Zugabe von 0,3 mM IPTG bei 37 °C für 16 h in LB-Medium durchgeführt. Nach erfolgter Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließender SDS-Gelelektrophorese konnte im Eluat jedoch nicht das gewünschte Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 36,9 kDa beobachtet werden. Es gab zwar Proteinbanden in dieser Größenordnung, jedoch mit annähernd gleicher Intensität vor und nach der Induktion. Aus diesem Grund handelt es sich vermutlich um Proteine des Wirtsorganismus. Dies und die Tatsache des fehlenden Proteins in der Elutionsfraktion deuten auf die fehlende Expression des Genes hin.



**Abb. 4-31: SDS-PAGE zu der Aufreinigung von EAU33872-His<sub>6</sub> (pCaW9) in *E. coli* M15 Zellen.** Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor der Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach der Induktion, Spur 4: lösliche Proteinfraction nach der Zentrifugation, Spur 5: Durchfluß-Fraktion, Spur 6: Waschfraktion, Spur 7: Elutionsfraktion.

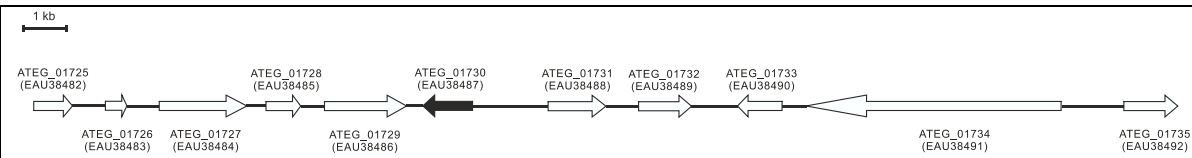
Aufgrund dieser Tatsache werden noch weitere Optimierungsschritte zum Erhalt des Proteins von Nöten sein. Optimierungsmöglichkeiten könnten hinsichtlich Kultivierungstemperatur und IPTG-Konzentration erfolgen. Auch ein Wechsel des Expressionstammes oder sogar des Expressionssystems, sowie des verwendeten Affinitäts-*tag* wären denkbar und könnten zum bisher verwehrteten Erfolg führen.

#### 4.1.6 Analysen zur putativen Prenyltransferase EAU38487 aus *A. terreus* DSM 1958

##### 4.1.6.1 Einleitung

Das putative Prenyltransferasegen *ATEG\_01730* ist auf dem Supercontig 2 von *A. terreus* NIH 2624 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NT\_165925.1) lokalisiert. Die durch NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorhergesagte Größe beträgt 1140 bp (2079388 bp – 2080527 bp) mit einem zugehörigen Genprodukt von 379 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 42,3 kDa. Anders als bei den anderen bearbeiteten Prenyltransferasegenen sollte hierbei nur ein Exon vorliegen. Durch Vorhersagen anhand eines größeren Sequenzabschnittes mittels FGENESH wurde ein möglicher erweiterter Sequenzbereich ermittelt mit einer Größe von 1305 bp (2079171 bp – 2080527 bp), welcher sich zudem über 2 Exons zu 1136 bp und 169 bp erstreckt. Diese wiederum werden durch ein Intron von 52 bp getrennt. Das putative Protein wurde durch Alignments mit anderen charakterisierten Prenyltransferasen bestätigt (Anhang Kapitel 7.1.1). Demzufolge umfasst das ermittelte Genprodukt nun 434 Aminosäuren und ein theoretisches Molekulargewicht von 48,6 kDa. EAU38487 zeigt laut Blast-Analysen Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene zu anderen Prenyltransferasen, wie AnaPT aus *N. fischeri* (Yin *et al.*, 2009b) mit 43 % oder zu CTrpPT aus *A. oryzae* (Zou *et al.*, 2010) mit 32 %, sowie zu MaPT aus *M. aurantiaca* (Ding *et al.*, 2008) mit 32 % und ebenso zu BrePT (Yin *et al.*, 2013a) mit 30% auf.

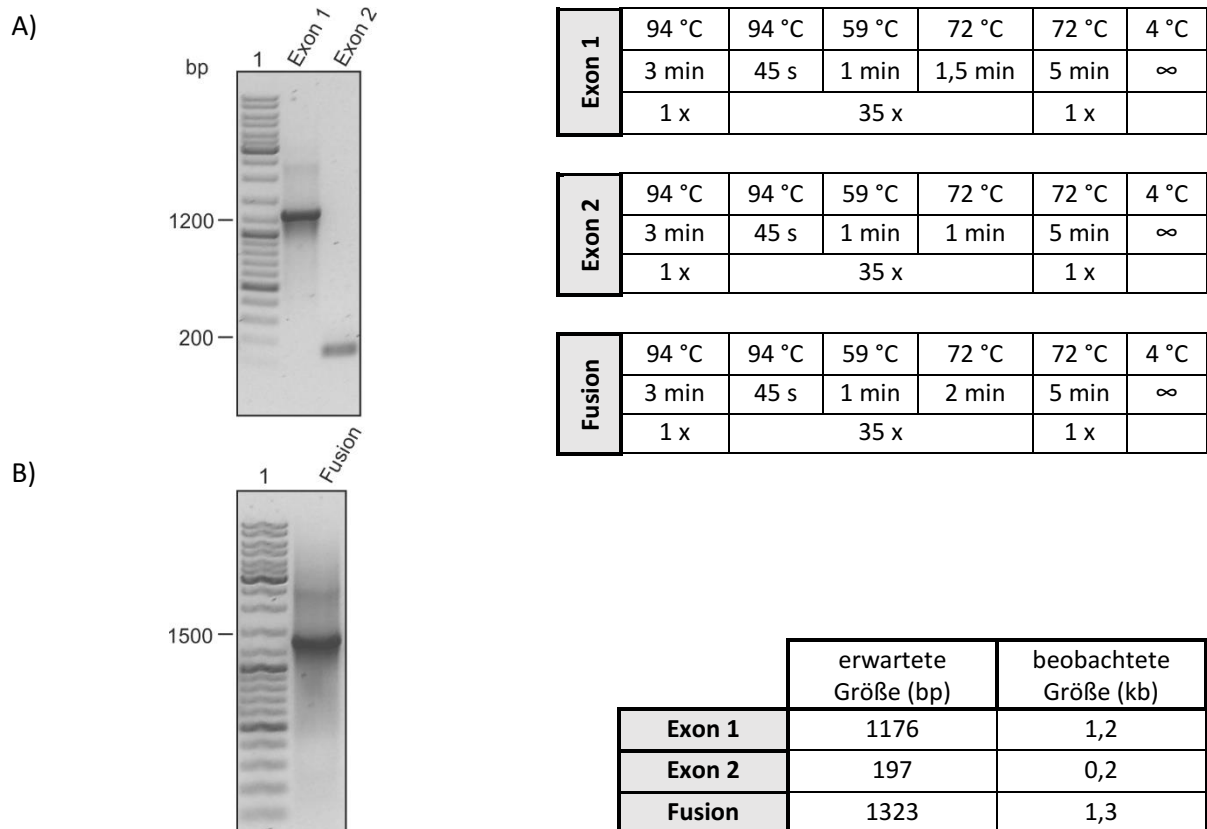
**Tab. 4-12: genetischer Kontext von *ATEG\_01730* auf dem Supercontig 2 (NT\_165925.1)**

				
Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>ATEG_01725</i>	EAU38482	276	2070499-2071386	Fructosaminkinase
<i>ATEG_01726</i>	EAU38483	139	2072123-2072614	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_01727</i>	EAU38484	600	2073346-2075354	<i>Berberin-Brücke-vermittelndes</i> Protein
<i>ATEG_01728</i>	EAU38485	251	2075797-2076594	Nukleosomen-Assemblierungsprotein
<i>ATEG_01729</i>	EAU38486	580	2077128-2079011	Oligo- $\alpha$ -1,6-Glucosidase
<b><i>ATEG_01730</i></b>	<b>EAU38487</b>	<b>379</b>	<b>2079388-2080527</b>	<b>Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie</b>
<i>ATEG_01731</i>	EAU38488	375	2082237-2083562	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_01732</i>	EAU38489	317	2084298-2085513	Triose-Phosphat-Transporter
<i>ATEG_01733</i>	EAU38490	291	2086567-2087588	SCO2-Protein
<i>ATEG_01734</i>	EAU38491	1889	2088157-2094004	Ankyrin-Strukturprotein
<i>ATEG_01735</i>	EAU38492	411	2095424-2096659	Unbekanntes Protein

Die Analyse von *ATEG\_01730* und angrenzender Gene (Tab. 4-12) zeigte keine unmittelbare Zugehörigkeit zu einem Sekundärmetabolit-Gencluster. Allerdings befindet sich mit *ATEG\_01727* ein Gen in unmittelbarer Nähe zu *ATEG\_01730*, welches für ein putatives Enzym mit einer Domäne kodiert, die wiederum Ähnlichkeiten zu einem Berberin-Brücken-vermittelnden Enzym aufweist. Diese Enzymklasse spielt unter anderem eine Rolle in der Biosynthese von Isochinolinalkaloiden in Pflanzen (Facchini *et al.*, 1996).

#### 4.1.6.2 Amplifikation von *ATEG\_01730* aus genomischer DNA von *A. terreus* DSM 1958

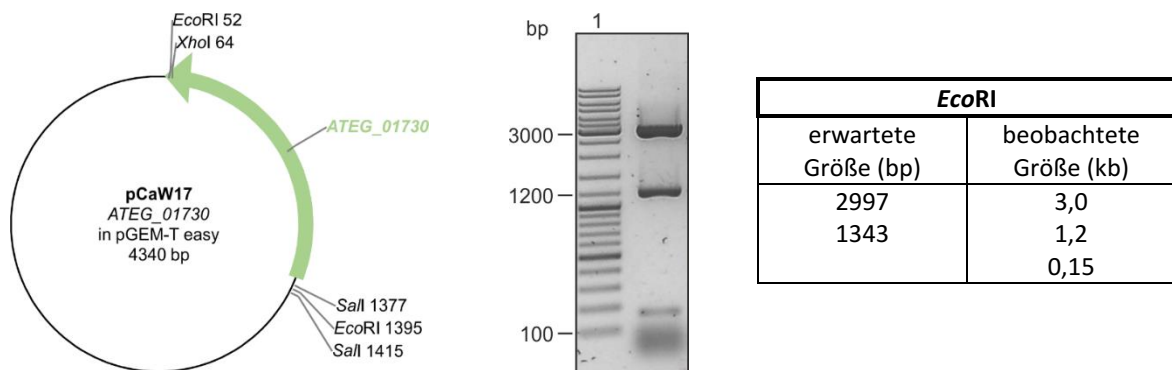
Die einzelnen Exons wurden durch Fusions-PCR (Kapitel 3.6.4) in einer ersten PCR-Runde separat amplifiziert und anschließend in einer 2. PCR-Runde fusioniert. Hierbei wurde auf das High Fidelity PCR-Kit (Roche) zurückgegriffen. Die Amplifikation des 1. Exons erfolgte durch die Primerkombination CaW\_01730-1/ CaW\_01730-3 (Abb. 4-32; A: Exon 1) und für das 2. Exon wurden die Primer CaW\_01730-2/ CaW\_01730-4 (Abb. 4-32; A: Exon 2) verwendet (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6). Zur Fusion beider Exons wurde die separaten PCR-Produkte als Matrize zusammen mit den flankierenden Primern CaW\_01730-1 und CaW\_01730-4 eingesetzt (Abb. 4-32; B: Fusion).



**Abb. 4-32:** Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *ATEG\_01730* aus genomischer DNA. A): Amplifikation der Exons 1 und 2 aus gDNA, B): Fusion Exon 1 und 2. Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

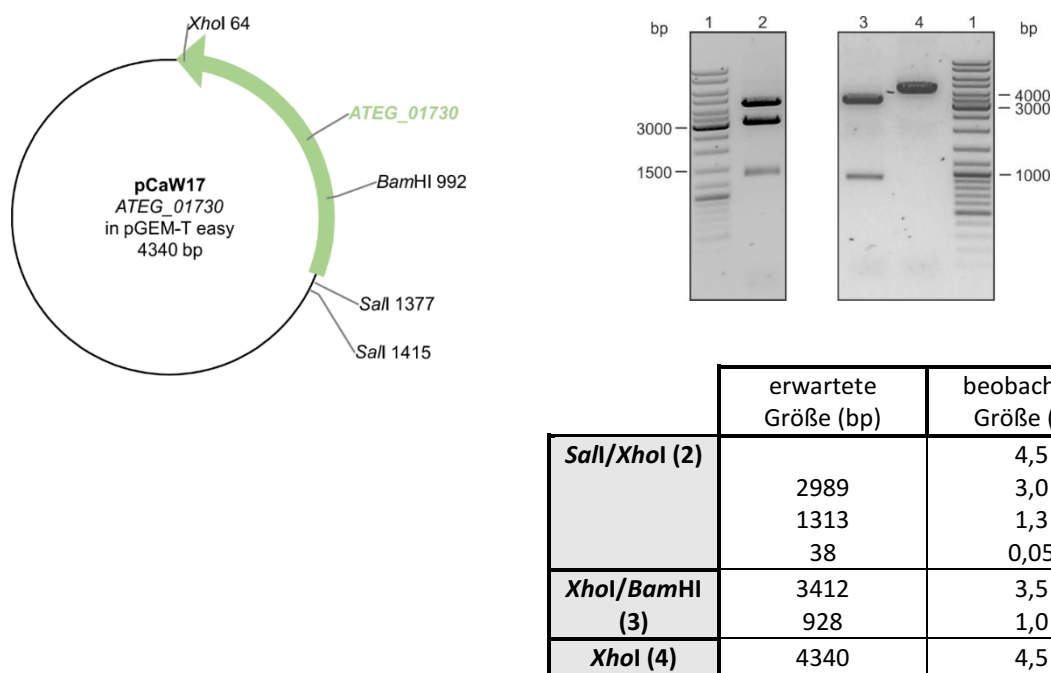
### 4.1.6.3 Klonierung und Transformation

Das erzeugte PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue MRF' eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die Überprüfung der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte durch einen *EcoRI*-Verdau (Abb. 4-33).



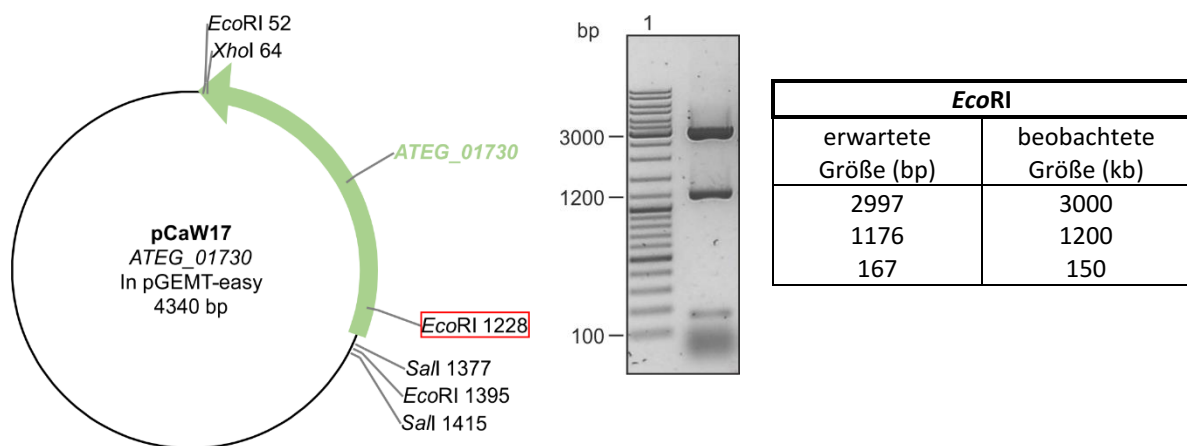
**Abb. 4-33: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW17 (ATEG\_01730 in pGEM-T Easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

Da das verdaute Plasmid pCaW17 nicht dem erwarteten Restriktionsmuster entsprach, jedoch die Gesamtheit der Fragmente die erwartete Konstruktgröße ausmachte, wurden weitere Kontrollverdaue durchgeführt. Anwendung hierbei fanden die Restriktionsenzyme *Sall*, *XhoI* und *BamHI* (Abb. 4-34).



**Abb. 4-34: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW17 (ATEG\_01730 in pGEM-T easy) und die zugehörige Vektorkarte.** Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Diesen Resultaten zur Folge zeigt das Konstrukt keine Fehler. Dennoch zur endgültigen Verifizierung wurde pCaW17 sequenziert und eine Mutation an Position 147 von Thymin zu Cytosin, welches zum Entstehen einer zusätzlichen *EcoRI*-Schnittstelle führte, festgestellt (Abb. 4-35). Ergänzend dazu liegen noch 3 weitere Mutationen vor, die auf Aminosäureebene zu folgenden Veränderungen führen: A<sub>179</sub> zu Q<sub>179</sub>, D<sub>290</sub> zu N<sub>290</sub>, sowie P<sub>333</sub> zu Q<sub>333</sub>. Die auftretenden Mutationen könnten auf mögliche Fehler der PCR hindeuten oder auf die Verwendung des unsequenzierten Stammes *A. terreus* DSM 1958 zurückzuführen sein.



**Abb. 4-35: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW17 (*ATEG\_01730* in pGEM-T Easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

## 4.2 Untersuchungen zu Nichtribosomalen Peptidsynthetasen und NRPS-ähnlichen Enzymen aus Ascomyceten

### 4.2.1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche putative Prenyltransferasegene identifiziert und teilweise biochemisch charakterisiert. Dabei rückten auch die oftmals gemeinsam in den Genclustern arrangierten Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) näher in den Fokus des Interesses. Diese Multidomain-Enzyme sind in der Lage komplexe regio- und stereospezifische Reaktionen durchzuführen, welche in der Biosynthese von biologisch aktiven und pharmazeutisch relevanten nichtribosomalen Peptiden münden. Sie inkorporieren dabei unter anderem auch untypische Aminosäuren, Fettsäuren und  $\alpha$ -Hydroxysäuren. Eine Sonderform hierbei bilden sogenannte NRPS-ähnliche Enzyme (NRPS-like), die aufgrund ihres veränderten Aufbaus keine Peptidbindung zwischen den aktivierten Substraten knüpfen, sondern in der Regel eine Claisen-Kondensation von zwei identischen  $\alpha$ -Ketosäuren katalysieren. Durch heterologe Expression bzw. Überexpression der Gene für die NRPS *AN9226* aus *A. nidulans*, *NFIA\_043670* aus *N. fischeri* und des NRPS-ähnlichen Enzyms *ATEG\_03090* aus *A. terreus* im mehrfach auxotrophen *Aspergillus* Stamm *A. nidulans* TN02A7 wurde die Akkumulation der zugehörigen nichtribosomalen Peptide erwartet. Diese sollten nach erfolgter Strukturaufklärung auch Rückschlüsse auf die natürlichen Substrate der beigeordneten Prenyltransferasen erlauben.



### 4.2.2 Charakterisierung der putativen NRPS EAA61517 aus *A. nidulans*

Tab. 4-13: genetischer Kontext von *AN9226* auf dem Contig 170 (NT\_107001.1)

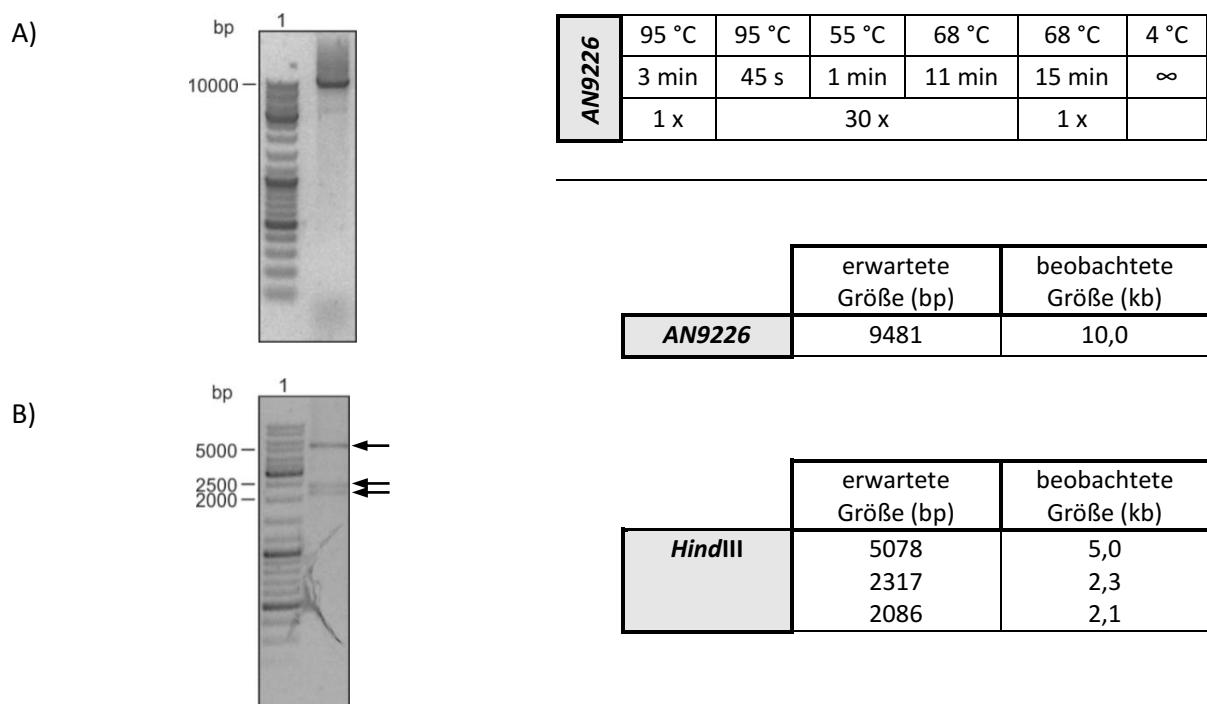
Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>AN9223</i>	EAA61514	289	171922-172908	O-Methyltransferase
<i>AN9224</i>	EAA61515	427	174644-176077	Monooxygenase
<i>AN9225</i>	EAA61516	475	176710-178438	Cytochrome P450-Enzym
<b><i>AN9226</i></b>	<b>EAA61517</b>	<b>2763</b>	<b>179001-187337</b>	<b>NRPS</b>
<i>AN9227</i>	EAA61518	308	187893-188819	Phytanoyl-CoA-Dioxygenase ähnliches Protein
<i>AN11193</i>	EAA61519	698	190366-192641	Hämocyanin-ähnliches Protein
<i>AN11201</i>		361	192926-194287	<i>Hydroxyneurosporinsynthase</i> ähnliches Protein
<i>AN11194</i>	EAA61520	451	194898-196350	Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie
<i>AN11202</i>		421	196713-198052	Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie
<i>AN9230</i>	EAA61521	589	199918-202097	Monooxygenase
<i>AN9231</i>	EAA61522	575	202507-204389	FAD-bindendes Enzym
<i>AN9232</i>	EAA61523	258	205055-205870	Enzym mit Ketoreduktase und Oxidoreduktase ähnlichen Domänen
<i>AN9233</i>	EAA61524	337	206433-207704	O-Methyltransferase

Das NRPS-Gen *AN9226* aus *A. nidulans* FGSC A4 ist Teil eines bisher unbekannten Sekundärmetabolit-Clusters (Tab. 4-13). Es befindet sich auf dem Contig 170, welcher dem IV. Chromosom zugeordnet wird (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NT\_107001.1; 532330 bp – 540177 bp). Die durch das Broad-Institut (<http://www.broadinstitute.org/>) vorhergesagte Größe beträgt 8337 bp (179001 bp – 187337 bp), welches wiederum für ein putatives Genprodukt EAA61517 von 2763 Aminosäuren kodiert. Der Annotierung zur Folge besteht das Gen aus 2 Exons zu 426 bp und 7866 bp, die durch ein Intron von 45 bp getrennt werden. EAA61517 besitzt einen bimodularen Aufbau mit einer Domänenstruktur A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>C<sub>1</sub>A<sub>2</sub>MT<sub>2</sub>C<sub>2</sub>. Jedes Modul besitzt eine Adenylierungs- (A), Thioester- (T) und Kondensationsdomäne (C), welche für die Biosynthese eines Dipeptides, u. U. eines zyklischen Dipeptides sprechen würden. Durch die Methyltransferase-Modifikationsdomäne könnte auch die Integration einer *N*-methylierten Aminosäure erfolgen. Nach Angaben des Vorhersageprogrammes zur Spezifität der Adenylierungsdomäne, dem NRPSpredictor 2

(Röttig *et al.*, 2011) sind beide Adenylierungsdomänen für die Inkorporation von zwei aliphatischen Aminosäuren verantwortlich. Die erste Adenylierungsdomäne A<sub>1</sub> besitzt den NRPS-Code G-M-I-I-V-A-A-G-I-K und die zweite Adenylierungsdomäne A<sub>2</sub> D-A-F-F-Y-G-C-I-V-K. Ein Vergleich der Adenylierungsdomänen mit anderen NRPS oder NRPS-like-Enzymen erbrachte für die erste Adenylierungsdomäne A<sub>1</sub> jedoch eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Aktivierung von Anthranilsäure (Ames & Walsh 2010; Kalb *et al.*, 2013). Für die zweite Adenylierungsdomäne A<sub>2</sub> konnten bisher keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden.

#### 4.2.2.1 Amplifikation des NRPS-Gens *AN9226* inklusive des-Promotor- und Terminatorbereiches

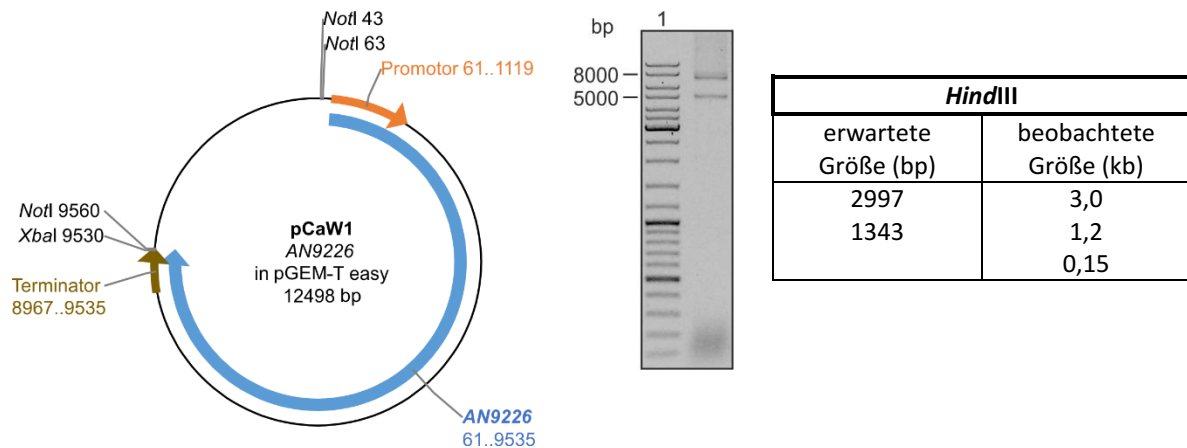
Um eine Expression von *AN9226* in *A. nidulans* TN02A7 zu ermöglichen, wurde der kodierende Bereich um 1044 bp im 5'-Bereich und um 562 bp im 3'-Bereich erweitert, in der Annahme das damit der geneigene Promotor, sowie Terminator erfasst wurde. Bisher gibt es keine adäquate Vorhersagemöglichkeit zur basengenauen Identifizierung von pilzlichen Promotor- und Terminatorsegmenten. Zur Amplifikation dieses Sequenzbereiches wurden die Primer CaW\_AN9226-1 und CaW\_AN9226-2 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) in Verbindung mit dem Expand Long Template PCR Kit (Roche) verwendet (Abb. 4-36).



**Abb. 4-36: A) Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *AN9226* aus genomischer DNA.** Amplifikation des erweiterten Sequenzbereiches, Laufspur 1: DNA-Größenstandard. B): Kontroll-Restriktionsverdau des erhaltenen PCR-Fragmentes.

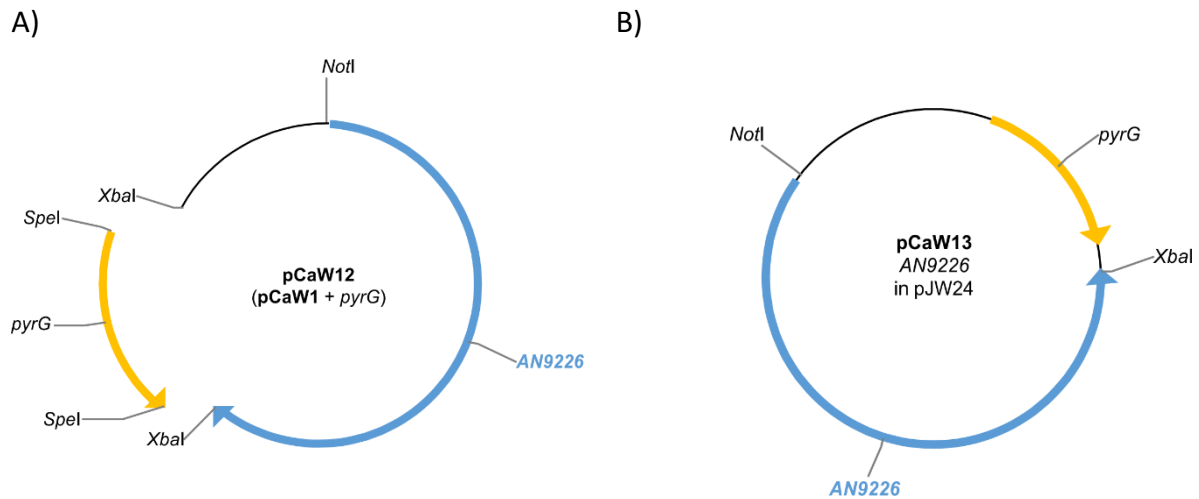
#### 4.2.2.2 Klonierung und Transformation

Das erhaltene PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und mittels Elektroporation in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> transformiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde durch einen *Hind*III-Verdau auf seine Korrektheit überprüft (Abb. 4-37).



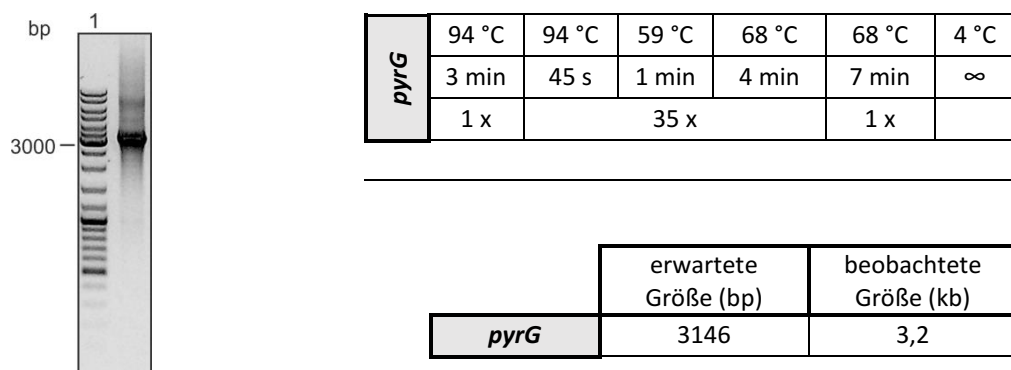
**Abb. 4-37: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW1 (AN9226 in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

Anschließend sollte die Umklonierung in den Expressionsvektor pJW 24 erfolgen. Dazu wurde das in pCaW1 enthaltene PCR-Fragment von AN9226 (9467 bp) mittels *Not*I und *Xba*I herausgeschnitten und in den mit *Not*I/*Xba*I linearisierten Expressionsvektor pJW24 ligiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> transformiert. Hierbei konnten zunächst jedoch keine positiven Klone erhalten werden. Daraufhin erfolgte die Anwendung verschiedenster Optimierungsschritte, beispielsweise ein sequentieller Verdau der Vektoren, Verwendung unterschiedlicher *E. coli*-Stämme, wie DH5 $\alpha$ , JM109 und nicht methylierende ET12567, jedoch ohne den gewünschten Erfolg. Der weiterführende Versuch der Klonierung in einen Cosmid-Vektor SuperCosI um eine höhere Aufnahmefähigkeit und strukturelle Stabilität zu erreichen, sowie die Anwendung der Mikrodialyse des Ligationsansatzes, welches die Verwendung größerer Mengen für die Elektroporation erlaubt, brachten ebenfalls nicht das gewünschte Ergebnis. Daraufhin wurden zwei Klonierungsstrategien parallel verfolgt (Abb. 4-38).



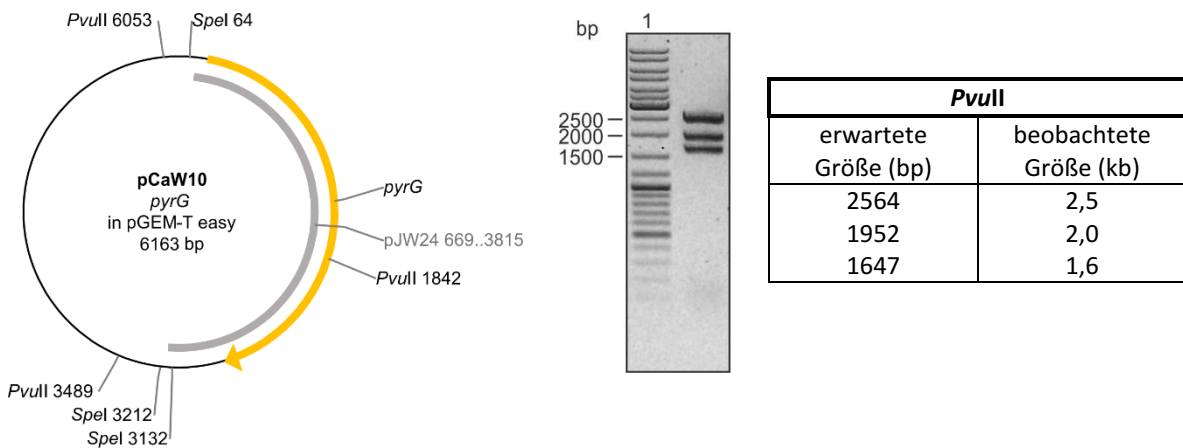
**Abb. 4-38: Klonierungsstrategien zum Erhalt eines Transformationskonstruktes mit AN9226 und dem Auxotrophiemarker *pyrG*.** A): Klonierung des Selektionsmarkers *pyrG* in den Vektor pCaW1 unter Verwendung kompatibler kohäsiver Enden der Restriktionsenzyme *XbaI* und *SpeI*. B): Klonierung von AN9226 in pJW24, welcher den benötigten Selektionsmarker *pyrG* bereits enthält. Dargestellt sind ausserdem sämtliche Restriktionsschnittstellen die zur Klonierung benötigt wurden.

Zur Erzeugung von pCaW12 wurde noch ein weiteres Zwischenkonstrukt für *pyrG* erstellt. Hierfür wurde mittels PCR ein Fragment aus pJW24 unter Verwendung der Primer KS und T3 amplifiziert (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6), welches *pyrG* enthält (Abb. 4-39).



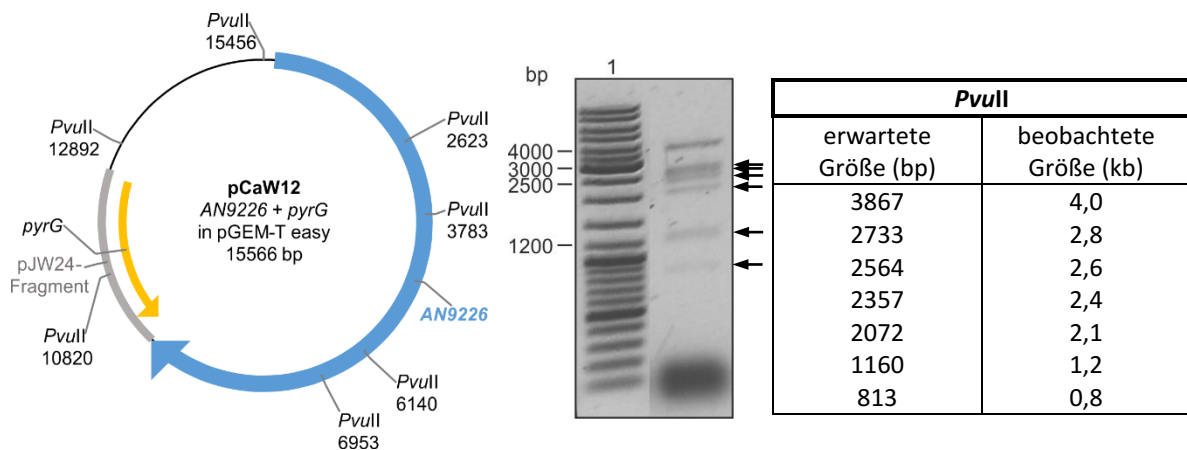
**Abb. 4-39: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *pyrG* aus pJW24 (669 bp – 3815 bp).** 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

Anschließend wurde das gewonnene PCR-Produkt nach einem *DraI*-Verdau zur Entfernung des verbliebenen Template-Vektors aufgereinigt, in pGEM-T easy ligiert und in *E. coli* XL10 Gold eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch einen *PvuII*-Verdau auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-40).



**Abb. 4-40:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW10 (*pyrG* in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

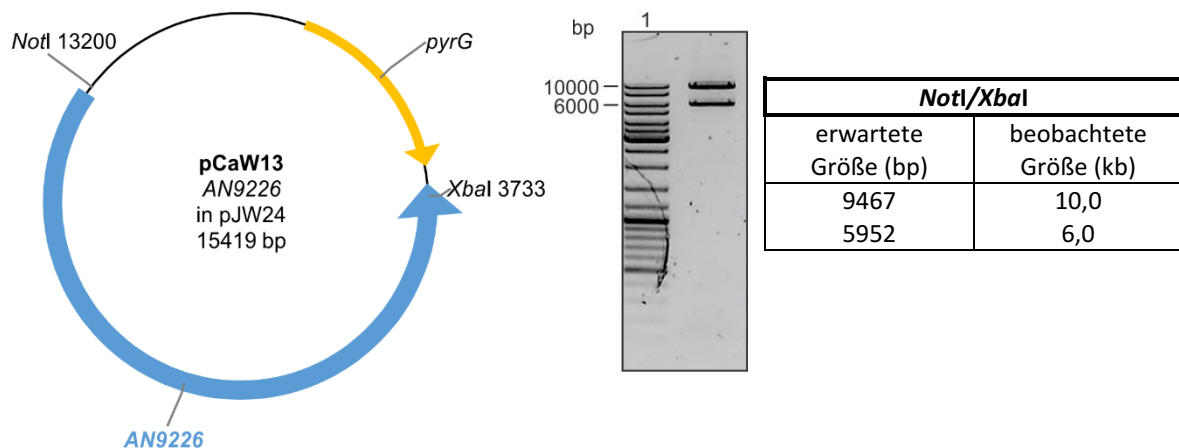
Durch die Öffnung von pCaW1 mit *XbaI* und das Erzeugen des *pyrG* beinhaltenden Fragmentes aus pCaW10 mittels *SpeI* sollte der Vektor pCaW12 hergestellt werden. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der entstandenen kompatiblen kohäsiven Enden beider Enzyme. Zusätzlich wurde dem Ligationsansatz *XbaI* hinzugegeben um der Religation des Zielvektors pCaW1 vorzubeugen. Mit der Einführung von *E. coli* XL10 Gold Zellen, die eine höhere Transformationseffizienz bei größerer Plasmiden aufzeigen, konnten die gewünschten Klone erzeugt werden. Der erhaltene Transformationsvektor pCaW12 wurde anschließend durch einen *PvuII*-Restriktionsverdau bestätigt (Abb. 4-41).



**Abb. 4-41:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW12 (*AN9226* + *pyrG* in pCaW1) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Anhand des beobachteten Restriktionsmusters konnte zusätzlich durch die dezentrale Position einer *PvuII*-Schnittstelle im Selektionsmarker *pyrG* dessen Orientierung im Vektor

pCaW12 bestimmt werden (Abb. 4-41, *PvuII* 10820). Etwa zeitgleich konnte auch der Vektor pCaW13 erstellt werden, hierfür wurde AN9226 mit *NotI* und *XbaI* aus pCaW1 herausgeschnitten und in den gleichermaßen vorbereiteten Vektor pJW24 ligiert. Nach Transformation in *E.coli* XL10 Gold und Aufreinigung des Plasmides erfolgte mittels *NotI/XbaI*-Restriktionsverdau die Überprüfung des Vektors auf seine Richtigkeit (Abb. 4-42).



**Abb. 4-42:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW13 (AN9226 in pJW24) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Das Plasmid pCaW13 wurde mittels PEG/CaCl<sub>2</sub>-vermittelter Protoplasten-Transformation des *pyrG*-defizienten Pilzstammes *A. nidulans* TN02A7 durchgeführt (Kapitel 3.6.13). Nach mehreren Anläufen konnten bei einem Titer von  $1,1 \times 10^8$  Protoplasten ml<sup>-1</sup> 28 putative Transformanten erhalten werden, die über drei weitere Selektionsrunden auf Uridin/Uracil-freiem Medium konditionell bestanden.

#### 4.2.2.3 Kultivierung und Analyse von *A. nidulans* TN02A7 Transformanten

Diese möglichen Kandidaten wurden in Selektionsflüssigkultur überführt, nach fünf Tagen das Mycel abgeerntet und die genomische DNA isoliert. Dabei kamen drei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Zum Einen die Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel: 3.6.1.1), die DNA-Minipräparation aus Mycel einer Kulturplatte (Saitoh *et al.*, 2006) und eine modifizierte Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 3.6.1.2). Die besten Ergebnisse konnten nach Vorgaben der letzten Methode erzielt werden. Exemplarisch ist das Ergebnis der genomischen DNA-Isolierung von einigen Transformanten dargestellt (Abb. 4-43).

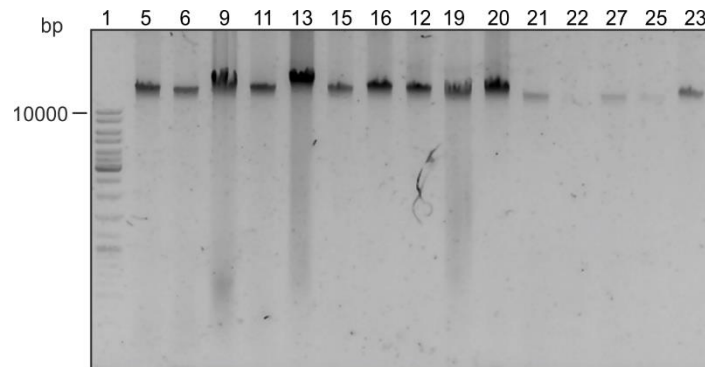


Abb. 4-43: Ergebnisse der genomischen DNA-Isolierung der Transformanten von *A. nidulans* TN02A7 mit AN9226 (pCaW13). Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

Anhand der erhaltenen genomischen DNA sollte die ektopische Integration von AN9226 in das Genom von *A. nidulans* TN02A7 via PCR nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich jedoch um die Insertion einer zweiten Kopie dieses Genes in das Genom, da in *A. nidulans* TN02A7 das Gen bereits vorhanden ist. Aus diesem Grund wurden Primer synthetisiert (AN9226-3 und pyrG-1; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6), die eine Amplifikation eines überlappenden Bereiches von AN9226 und *pyrG* erlaubten und somit die Integration bestätigten (Abb. 4-44).

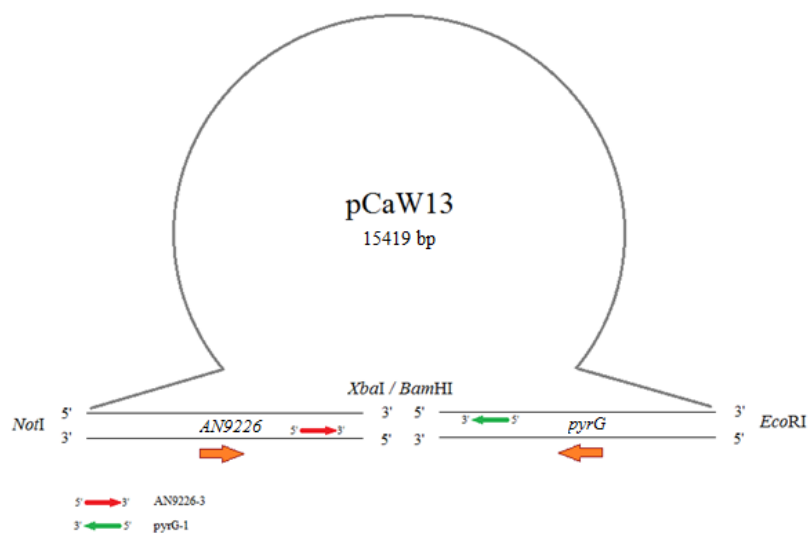
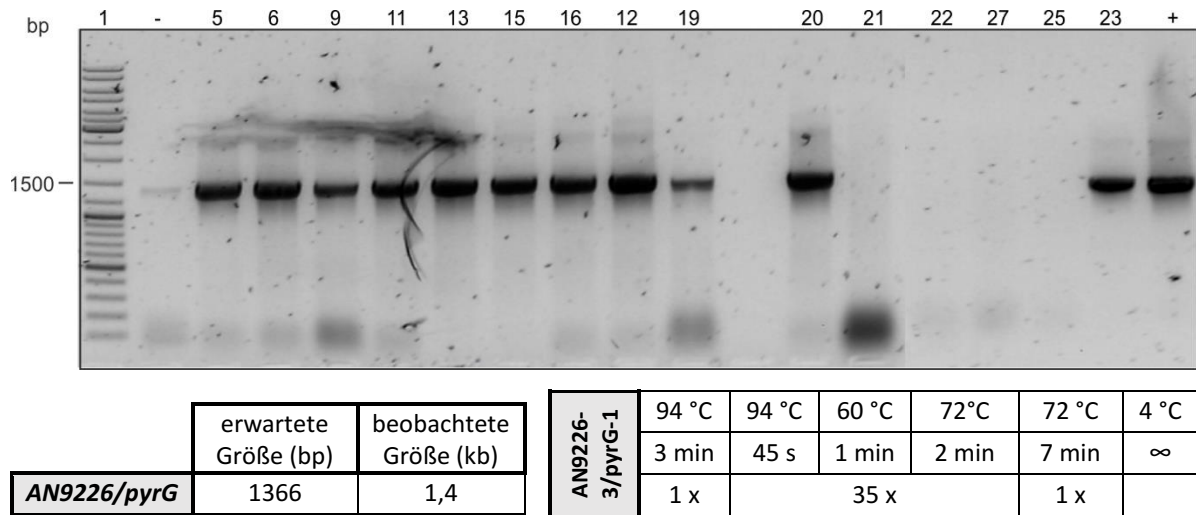


Abb. 4-44: Amplifikationschema des überlappenden Bereiches von AN9226 und *pyrG*

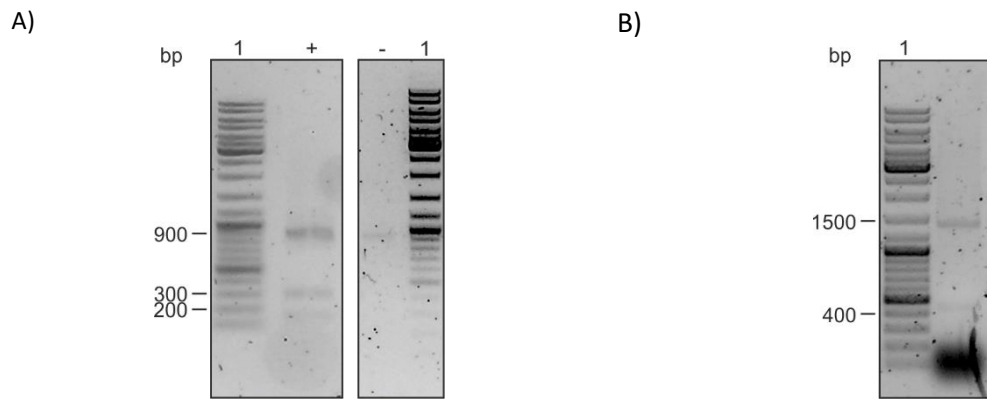
Das erwartete Amplifikat hatte dabei eine Größe von 1366 bp und konnte für eine Vielzahl von Transformanten erhalten werden, leider jedoch auch in der Negativkontrolle mit genomischer DNA des untransformierten *A. nidulans* TN02A7 (Abb. 4-45).



**Abb. 4-45: PCR-Nachweis für die Integration einer zweiten Kopie AN9226 ins Genom von *A. nidulans* TN02A7.** Laufspur 1: DNA-Größenstandard; – Negativkontrolle entspricht *A. nidulans* TN02A7; + Positivkontrolle entspricht pCaW13. Die Nummerierung entspricht dem jeweiligen Transformanten.

Zur Feststellung der Identität des PCR-Produktes in der Negativkontrolle wurde es vergleichend zu einem Fragment von Transformant CaW11 mittels Restriktionsverdau *EcoRV/HindIII* untersucht. Hierbei konnte lediglich für den Transformant CaW11 das gewünschte Restriktionsmuster erhalten werden (Abb. 4-46; A). Bei der Negativkontrolle konnte aufgrund der geringen Menge kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. Hier wurde nur ein Fragment beobachtet, welches zwar auf einen Verdau schließen lässt, aber übrige Fragmente nicht nachweisbar waren. Eine ergänzende Wiederholung der PCR für die Negativkontrolle zeigte jedoch ein anderes Ergebnis, bei dem noch eine weitere Fragmentbildung bei 450 bp beobachtet wurde (Abb. 4-46; B), welches auf eine unspezifische Fehl amplifikation während der PCR hindeutet. Aufgrund dieser Unterschiede wurden sämtliche Transformanten zu diesem Zeitpunkt als positiv eingestuft.



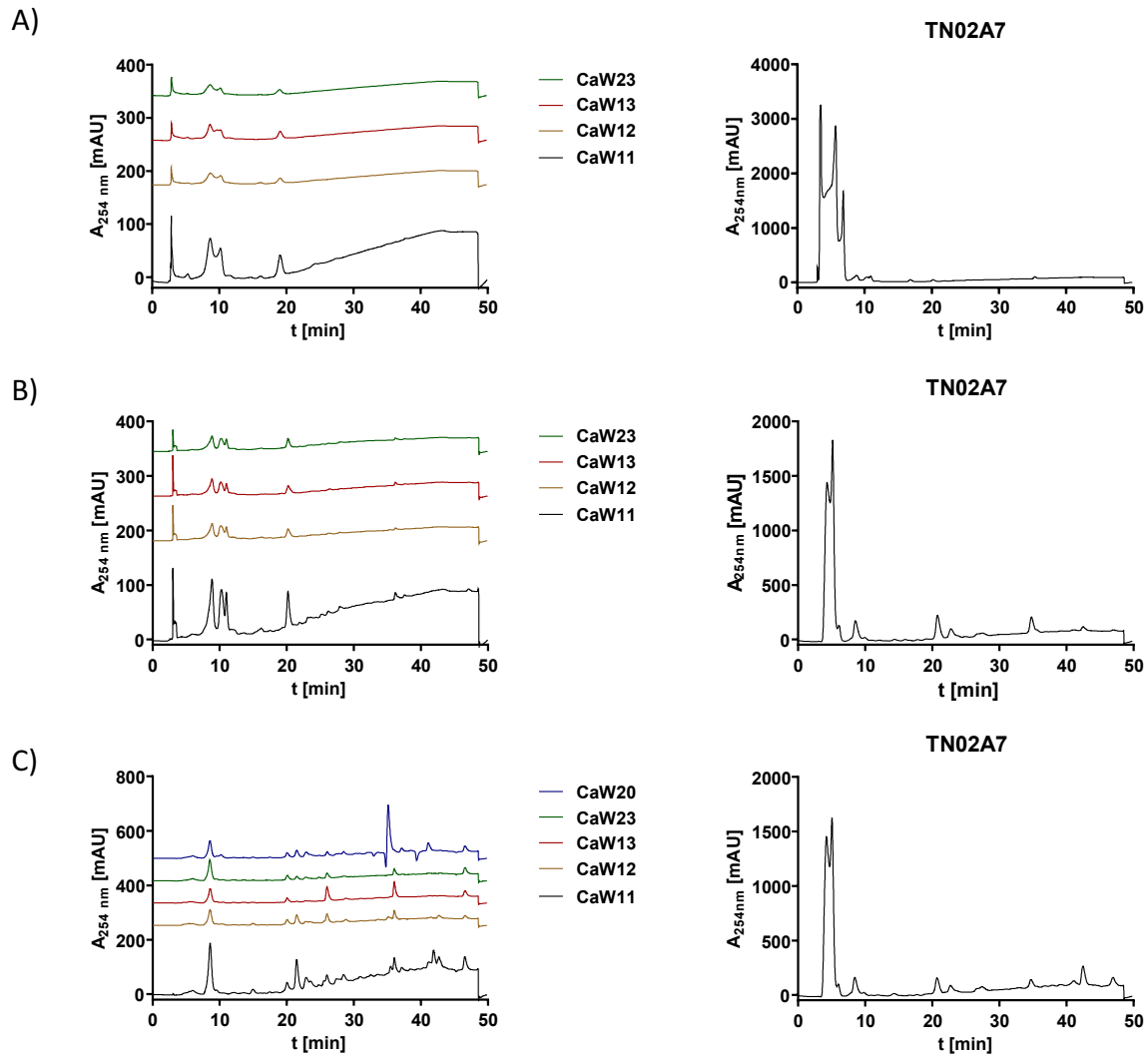


<i>EcoRV</i> <i>/HindIII</i>	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
(+)	906 302 158	0,9 0,3 0,15
(-)	-	1,0

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<b>AN9226-3 /pyrG1</b>	-	1,4 0,45

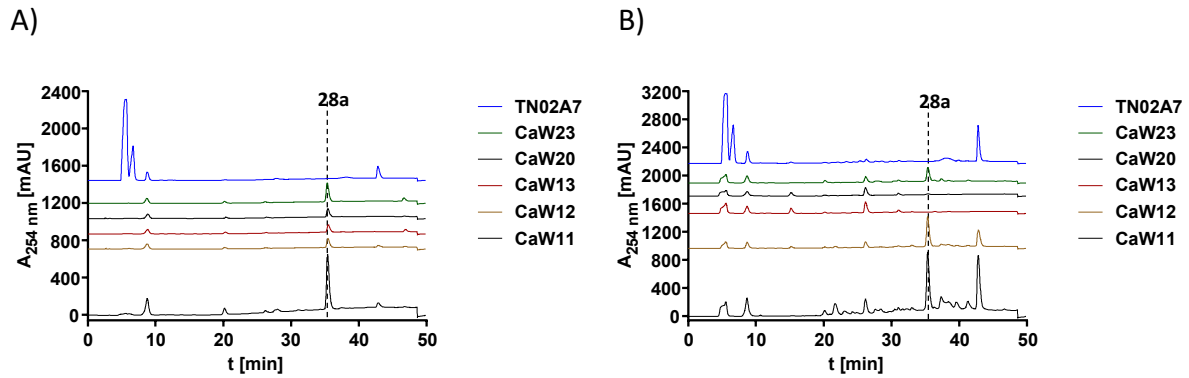
**Abb. 4-46: A) *EcoRV/HindIII*-Verdau der PCR-Fragmente sowohl der Positiv-, als auch Negativkontrolle B) Wiederholung der PCR für die Negativkontrolle.** Laufspur 1: DNA-Größenstandard; – entspricht *A. nidulans* TN02A7; + entspricht Transformant CaW11.

Nach den drei Selektionsrunden auf Uridin/Uracil-freien Medien verblieben jedoch lediglich 5 konditionell stabile Transformanten mit der Bezeichnung *A. nidulans* CaW11 (AN9226), CaW12, CaW13, CaW20 und CaW23. Zunächst erfolgte die Kultivierung in HM-Medium für jeweils 5, 12 und 21 Tage. Im Fall von Transformant CaW20, aufgrund eines langsameren Wachstums, lediglich über 21 Tage. Die Kulturüberstände wurden mit Ethylacetat ausgeschüttelt und mittels HPLC analysiert (Abb. 4-47).



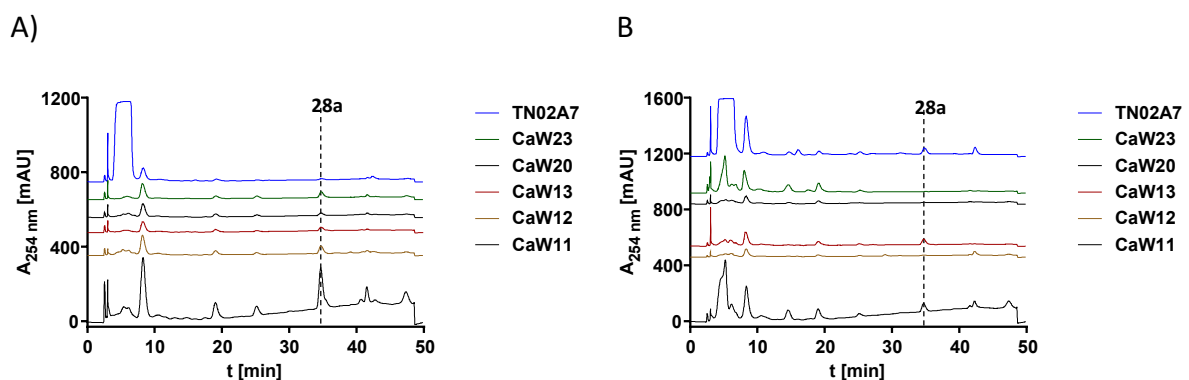
**Abb. 4-47:** HPLC-Chromatogramme der Kulturüberstände der Transformanten im Vergleich zum untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 jeweils A) nach 5 Tagen B) nach 12 Tagen und C) nach 21 Tagen. Das untere Chromatogramm (CaW11) entspricht den tatsächlichen Gegebenheiten hinsichtlich der Absorption (y-Achse). Die anderen Chromatogramme stehen ohne direkten Bezug zur y-Achse.

Anhand der HPLC-Chromatogramme der Transformanten konnte unter diesen Kultivierungsbedingungen kein zusätzlicher Peak oder eine deutliche Intensitätszunahme eines beiderseits vorhandenen Peaks, vergleichend zum untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7, beobachtet werden. Wobei mit zunehmender Kultivierungsdauer eine größere Vielfalt der Produktpeaks festgestellt werden konnte. Im weiteren Versuchsverlauf wurden noch 2 weitere Medien zur Kultivierung herangezogen, zum einen ein weiteres Vollmedium CDH und ein Minimalmedium AMM (Abb. 4-48).



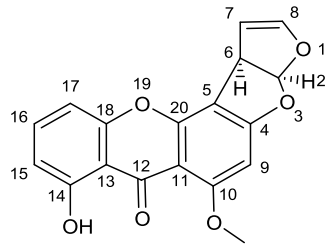
**Abb. 4-48:** HPLC-Chromatogramme der Kulturüberstände der Transformanten im Vergleich zum untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 jeweils nach erneuter Kultivierung für 5 Tage A) in AMM- B) in CDH-Medium. Das untere Chromatogramm (CaW11) entspricht den tatsächlichen Gegebenheiten hinsichtlich der Absorption (y-Achse). Die anderen Chromatogramme stehen ohne direkten Bezug zur y-Achse.

Hierbei konnten im Vergleich zum HM-Medium bereits nach lediglich 5 Tagen Veränderungen im Sekundärmetabolitspektrum beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die weiteren Arbeiten unter Verwendung dieser Medien fortgeführt. In beiden Medien zeigte sich die erhöhte Produktion eines Produktes (**28a**) mit einer Retentionszeit von 35,5 min, welches im untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 in allen drei Medien nur in deutlich geringerem Maße synthetisiert wurde. Weiterführend wurde auch das Mycel hinsichtlich der Sekundärmetabolitproduktion analysiert (Abb. 4-49). Auch hier konnte das Produkt (**28a**) mit der Retentionszeit von 35,5 min erneut beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Isolierung dieses Produktpeaks aus dem Transformanten *A. nidulans* CaW11 (AN9226) mittels HPLC zur Strukturaufklärung über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie angestrebt.



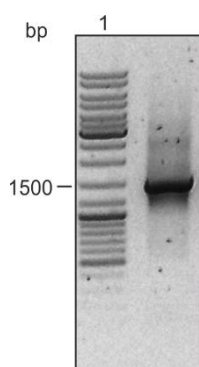
**Abb. 4-49:** HPLC-Chromatogramme der Mycelextrakte der Transformanten im Vergleich zum untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 jeweils nach 5 Tagen A) in AMM- B) in CDH-Medium. Das untere Chromatogramm (CaW11) entspricht den tatsächlichen Gegebenheiten hinsichtlich der Absorption (y-Achse). Die anderen Chromatogramme sind ohne direkten Bezug zur y-Achse.

**Tab. 4-14:  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von Sterigmatocystin und des Isolats (Peak 35,5 min Retentionszeit).** Das Spektrum wurde an einem JEOL ECA-500 Spektrometer aufgenommen. Chemische Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in ppm und Kopplungskonstanten in Hz angegeben.

		
	Sterigmatocystin (Ashley <i>et al.</i> , 1987) $\delta_{\text{H}}$ , multi., $J$ [Hz]	Isolat (28a) $\delta_{\text{H}}$ , multi., $J$ [Hz]
Proton	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$
2	6,83; d; 7,2	6,84; d; 7,1
6	4,82; ddd; 7,2; 2,4; 2,0	4,82; dt; 7,1; 2,2
7	5,45; dd; 2,9; 2,4	5,45; t; 2,6
8	6,50; dd; 2,9; 2,0	6,50; dd; 2,7; 2,2
9	6,44; s	6,45; s
10- $\text{OCH}_3$	3,99; s	3,99; s
15	6,76; dd; 8,4; 1,0	6,76; dd; 8,3; 0,8
16	7,50; t; 8,3	7,51; t; 8,3
17	6,83; dd; 8,3; 1,0	6,84; dd; 8,4; 0,9

Das Isolat zeigte beim Vergleich mit Literaturdaten (Ashley *et al.*, 1987) eine vollständige Übereinstimmung mit Sterigmatocystin, einem Zwischenprodukt aus der Aflatoxinbiosynthese (Tab. 4-14; Anhang Abb. 7-42). Auch die massenpektrometrische Analyse mit einer gemessenen Masse von  $m/z = 324,06$  bestätigte dieses Resultat (Anhang Abb. 7-44). Die Struktur ist durch seinen xanthonartigen Aufbau gekennzeichnet, welcher auf der Biosynthese durch eine

Polyketidsynthese beruht. Es handelt sich somit um eine Substanz, die nicht direkt auf die Aktivität der inserierten Nicht-ribosomalen Peptidsynthetase EAA61517 (AN9226) zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden weitere Versuche unternommen eine nachweisbare, zusätzliche Sekundärmetabolitproduktion über eine erhöhte Expression von AN9226 zu bewirken. Dazu wurde beispielsweise ein Konstrukt erstellt, bei welchem artifiziell der konstitutive *gpdA* Promotor (*gpdA<sub>p</sub>*) vorgeschaltet wurde (Punt *et al.*, 1990). In einem ersten Schritt wurde mittels PCR der Promotor aus dem Genom von *A. nidulans* FGSC A4 mit Hilfe der Primer CaW\_ *gpdA*\_fw und CaW\_ *gpdA*\_rv (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) gewonnen (Abb. 4-50).

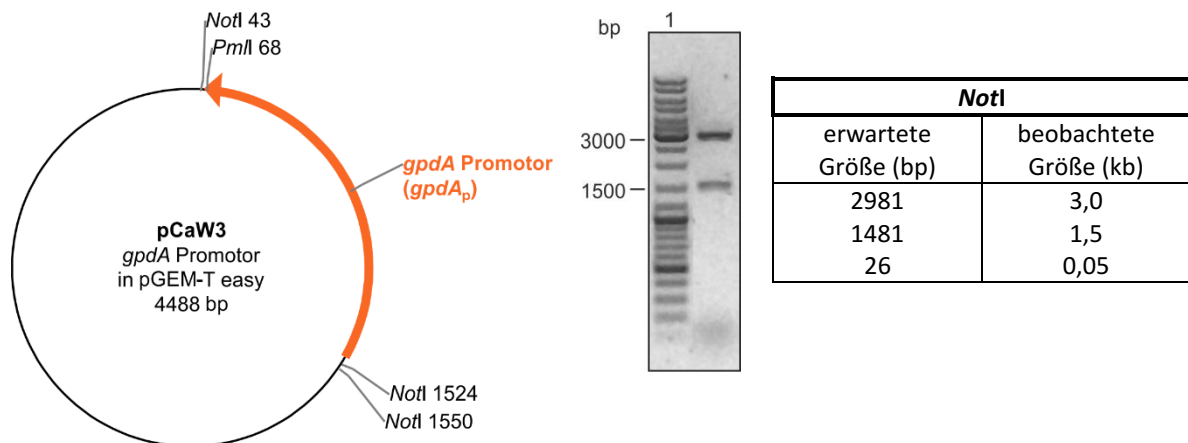


<i>gpdA<sub>p</sub></i>	94 °C 3 min 1 x	94 °C 45 s 35 x	58 °C 1 min 35 x	72 °C 2 min 35 x	72 °C 7 min 1 x	4 °C ∞ 1 x
-------------------------	-----------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	-----------------------	------------------

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<i>gpdA<sub>p</sub></i>	1471	1,5

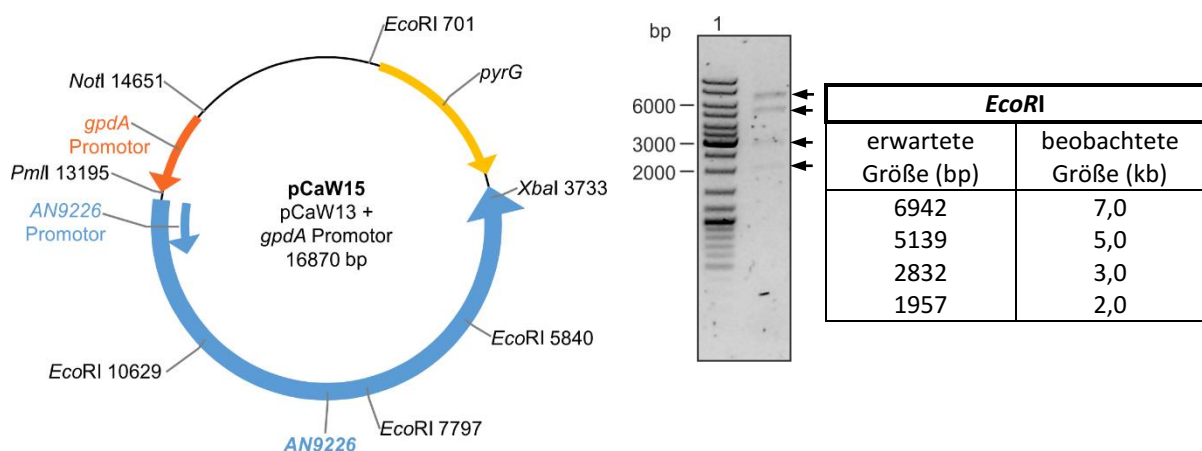
**Abb. 4-50: 0,8 %iges Agarosegel der PCR-Amplifikation von *gpdA<sub>p</sub>*.** 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

Das erhaltene PCR-Fragment wurde anschließend in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert und durch Hitzeschock in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines *NotI*-Verdaus auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-51).



**Abb. 4-51:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW3 (*gpdA<sub>p</sub>* in pGEM-T easy) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Der *gpdA* Promotor wurde daraufhin über die Restriktionskombination *NotI*/*PmlI* aus pCaW3 herausgeschnitten und in den gleichermaßen vorbereiteten Vektor pCaW13 ligiert. Das neu entstandene Transformationskonstrukt pCaW15 wurde somit um einen starken konstitutiven Promotor zur angestrebten Überexpression von *AN9226* in *Aspergillus* sp. erweitert. Durch einen Restriktionsverdau mittels *EcoRI* konnte die Richtigkeit des Plasmides bestätigt werden (Abb. 4-52).

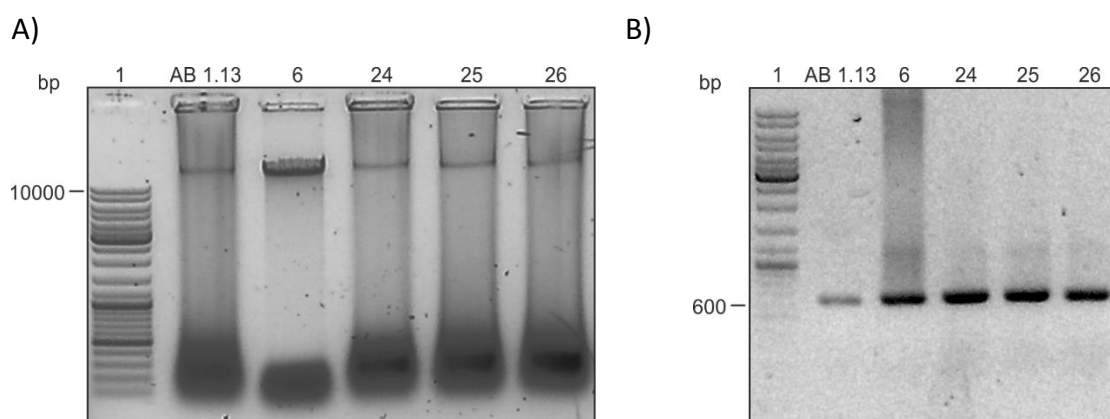


**Abb. 4-52:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW15 (*gpdA<sub>p</sub>* in pCaW13) und die zugehörige Vektorkarte. Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

In diesem Fall erfolgte die Transformation der Plasmide pCaW15 und pCaW13 in den Uridin/Uracil-auxotrophen Stamm *A. niger* AB 1.13. Dieser bietet den Vorteil nicht bereits über eine Kopie des Genes *AN9226* zu verfügen und somit die Möglichkeit einer eindeutigeren Identifizierung eines zugehörigen Sekundärmetabolites.

#### 4.2.2.4 Kultivierung und Analyse von *A. niger* AB 1.13 Transformanten

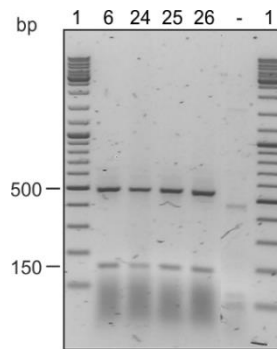
Nach drei Selektionsrunden auf Uridin/Uracil-freiem Medium verblieben vier Transformanten mit mäßigem Wachstum. Zum einen *A. niger* CaW06 (*AN9226*), welcher durch die Transformation mit pCaW13 erhalten wurde und zum anderem *A. niger* CaW24 - 26 (*AN9226*), welche mit pCaW15 erzeugt wurden. Dennoch erfolgte die Isolierung der genomische DNA aus diesen Transformanten (Abb. 4-53; A) und mit Hilfe der geninternen Primer *AN9226*-3 und *AN9226*-4 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) konnte die Insertion von *AN9226* ins Genom mittels PCR bei allen genannten Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 4-53; B).



**Abb. 4-53: 1 %ige Agarosegele zur Überprüfung der genomischen DNA-Isolierung (A) und der Kontroll-PCR (B).** 6, 24-26 kennzeichnen den jeweiligen Transformanten CaW06, CaW24-26. AB 1.13 ist die Positivkontrolle *A. niger* AB 1.13.

<i>AN9226</i> -3/4	94 °C	94 °C	55°C	72°C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	60 s	60 s	7 min	∞
	1 x	30 x			1 x	
		erwartete Größe (bp)		beobachtete Größe (kb)		
<i>AN9226</i>		647		0,6		

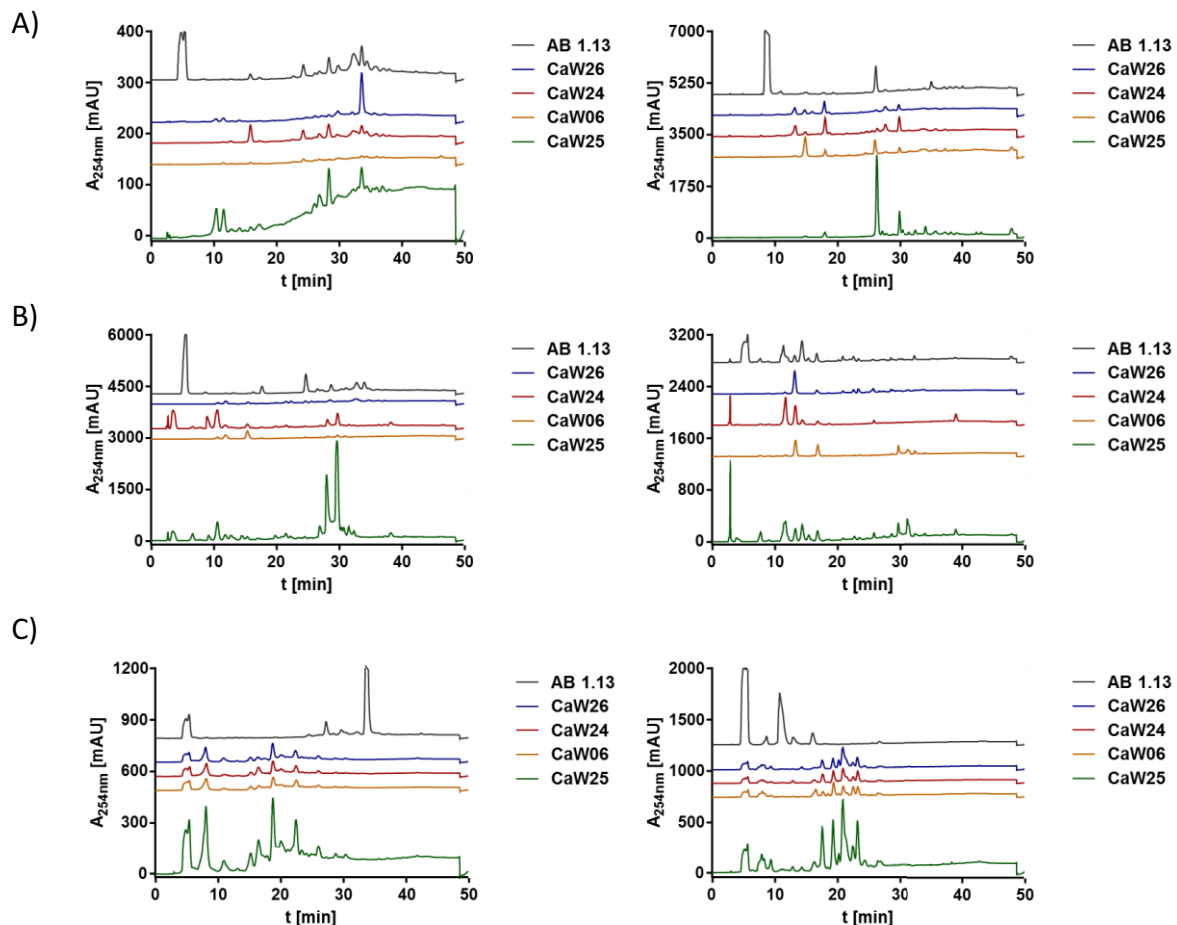
Leider konnte hierbei erneut ein PCR-Fragment beim untransformierten Stamm *A. niger* AB 1.13 beobachtet werden. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die PCR-Fragmente mittels *Bam*HI verdaut (Abb. 4-54).



<i>Bam</i> HI	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
6, 24, 25, 26	497 150	0,5 0,15
AB 1.13 (-)	-	0,45 0,1

**Abb. 4-54: 1,4 %iges Agarosegel zur Darstellung der Kontrollrestriktionen.** 6, 24-26 kennzeichnen die Restriktionsansätze der jeweiligen Transformanten CaW06, CaW24-26. - Verdau des PCR Fragmentes im Falle von *A. niger* AB 1.13.

Das für den untransformierten Stamm *A. niger* AB 1.13 erhaltene PCR-Fragment zeigte ein deutlich anderes Restriktionsmuster als diejenigen der Transformanten und es ist daher von einer Fehlamlifikation bei der PCR durch fehlerhafte Hybridisierung der Primer auszugehen. Die Transformanten und der Kontrollstamm *A. niger* AB 1.13 wurden daher in den Medien AMM, PG und CDH zur vergleichenden Untersuchung der Sekundärmetabolitproduktion für 7 Tage kultiviert (Abb. 4-55).



**Abb. 4-55: HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltrate der Transformanten im Vergleich zum untransformierten Stamm *A. niger* AB 1.13 jeweils nach 7 Tagen A) in AMM- B) PD-Medium C) in CDH-Medium.** Links: 1. Analyse, rechts: Reproduktion. Das untere Chromatogramm (CaW25) entspricht den tatsächlichen Gegebenheiten hinsichtlich der Absorption (y-Achse). Die anderen Chromatogramme sind ohne direkten Bezug zur y-Achse.

Jeder Kultivierungsversuch wurde zur Reproduktion der Ergebnisse jeweils zweimal durchgeführt. Dabei konnten für PG- und AMM-Medium keine identischen Ergebnisse erhalten bzw. keine Unterschiede zum untransformierten Stamm *A. niger* AB 1.13 identifiziert werden. Lediglich in CDH-Medium konnten bei den Transformanten wiederholt Sekundärmetabolite mit Retentionszeiten im Bereich von 18 - 24 Minuten beobachtet werden (Abb. 4-55; C). Im Vergleich zu den Transformanten *A. niger* CaW24 – 26 (AN9226) wurde der Transformant *A. niger* CaW06 (AN9226) nicht mit dem Konstrukt pCaW15 generiert, sondern mit pCaW13. Demzufolge verfügt dieses Konstrukt lediglich über den eigenen Promotor und sollte daher geringere Expressionsraten von AN9226 und entsprechende Produktbildung aufzeigen, als Transformanten mit zusätzlichem *gpdA* Promotor. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden, da sämtliche Transformanten auch im CDH-Medium gleiche Sekundärmetabolitmuster und Intensitäten aufzeigten. Eine mögliche Ursache könnte in unterschiedlichen Wachstumsraten begründet liegen, welche Einfluss auf die Sekundärmetabolitproduktion hätten. Subjektiv konnten jedoch keine auffälligen Unterschiede beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden auch diese Transformanten nicht für weitere Arbeiten verwendet.

#### 4.2.2.5 Deletion von Promotor AN9226p im Konstrukt pCaW15

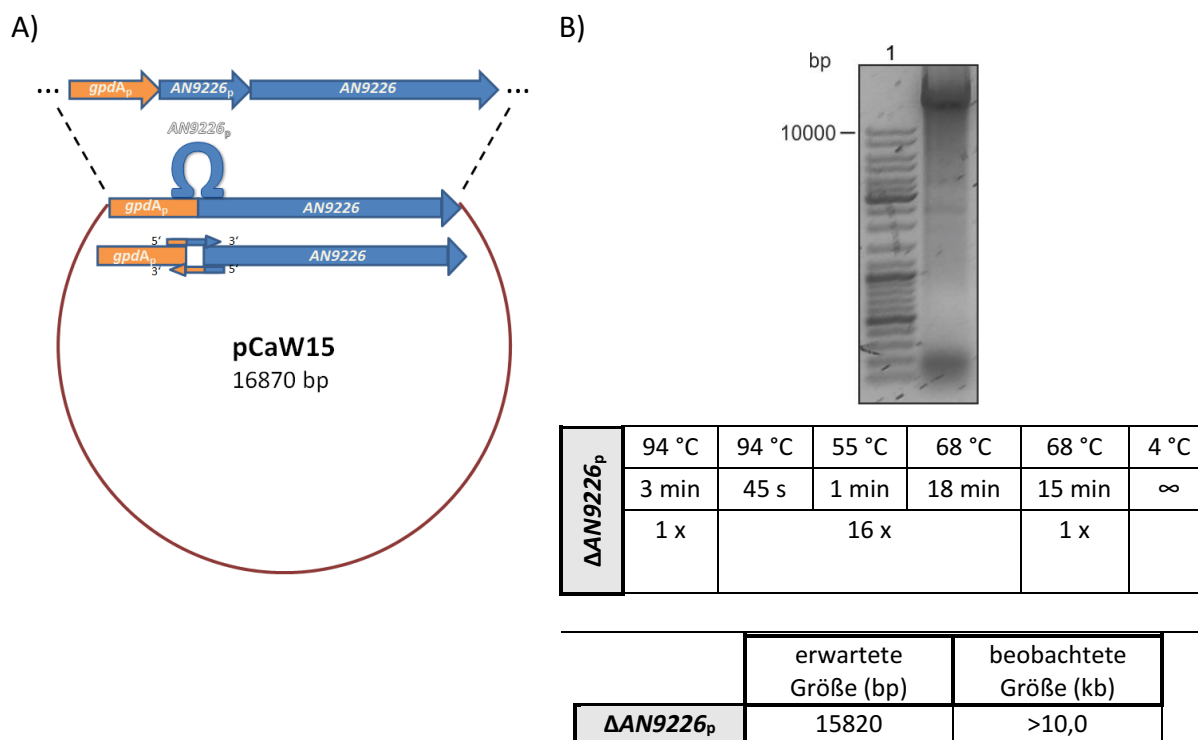
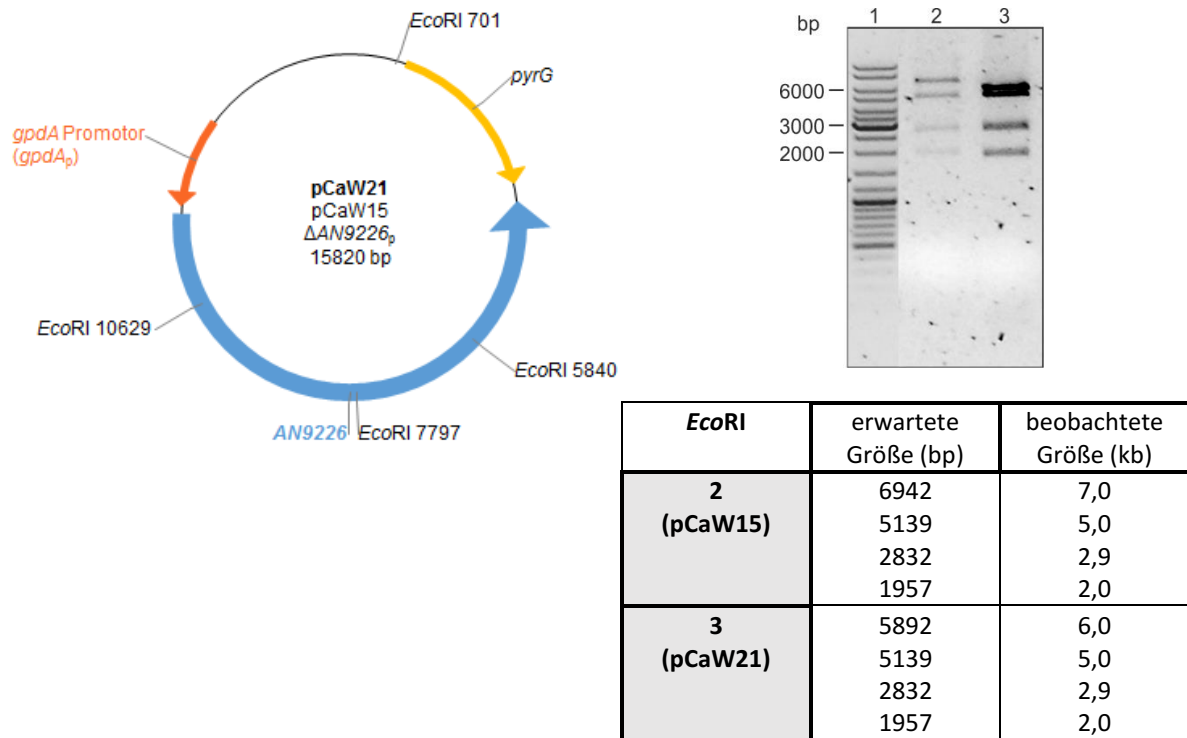


Abb. 4-56: 0,6 %iges Agarosegel zur Darstellung der Deletion (A), sowie PCR-Konditionen (B). 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

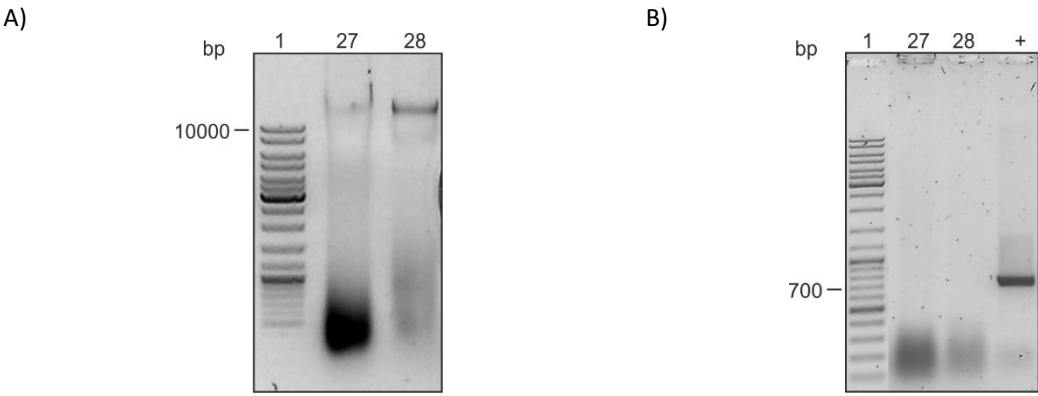


Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die fehlende Akkumulation des mit AN9226 in Verbindung stehenden Sekundärmetaboliten rückte der Einfluss der verwendeten Promotoren in den Focus. Im Konstrukt pCaW15 befinden sich aufeinanderfolgend sowohl der konstitutive *gpdA* Promotor (*gpdA<sub>p</sub>*), als auch der eigene Promotor AN9226<sub>p</sub> (Abb. 4-56; A). Diese Kombination beider Promotoren wurde angestrebt um durch die Erhöhung der Anzahl transkriptionsfördernder cis-Elemente auch eine erhöhte Transkriptionsaktivität zu erzielen. Sollte der Promotor von AN9226 jedoch nur eine geringe Aktivität erlauben, beispielsweise aufgrund weniger oder anderer Response Elemente, kann dies dazu führen, dass auch mit Hilfe des nachgeschalteten *gpdA* Promotors keine Erhöhung der Transkription erreicht werden kann, da sich dieser nicht in unmittelbarer Umgebung des Transkriptionsstartpunktes befindet. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Deletion des eigenen Promotors von AN9226 im Konstrukt pCaW15 durchgeführt und die erneute Transformation der uridin-auxotrophen *Aspergillus* Stämme angestrebt. Mittels PCR wurde die Deletion des eigenen Promotors von AN9226 (AN9226<sub>p</sub>) durchgeführt (Abb. 4-56; B). Durch das Design von Primern (CaW\_*gpdA*\_dAN9226-1 und CaW\_*gpdA*\_dAN9226-2; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) mit überlappenden Sequenzen am 3'-Ende vom *gpdA*-Promotor und dem 5'-Ende des Genes AN9226 konnte der nicht benötigte Sequenzabschnitt (AN9226<sub>p</sub>) des Plasmides pCaW15 ausgespart (1050 bp) und somit entfernt werden (Zheng *et al.*, 2004). Das parentale methylierte Plasmid wurde mittels *DpnI*-Verdau entfernt und ein Teil des PCR-Ansatzes in *E. coli* XL10 Gold transferiert und das letztlich entstandene Plasmid pCaW21, sowohl isoliert, als auch vergleichend mit *EcoRI* auf seine Richtigkeit überprüft (Abb. 4-57).



**Abb. 4-57: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW21 (pCaW15 mit  $\Delta AN9226_p$ ) und die zugehörige Vektorkarte.** Dargestellt sind die für die Überprüfung wichtigen Restriktionsschnittstellen.

Weiterführend wurde pCaW21 ebenfalls für die Transformation von *A. nidulans* TN02A7 verwendet. Es konnten jedoch lediglich 2 Transformanten erhalten werden, welche nach drei Selektionsrunden auf Uridin-/Uracil-freiem Medium zur Isolierung der genomischen DNA und Analyse der Sekundärmetabolitproduktion 5 Tage kultiviert wurden, *A. nidulans* CaW27 (AN9226) und CaW28. Mit Hilfe der Primer AN9226-3 und AN9226-4 und der genomischen DNA erfolgte daraufhin die Identitätsprüfung mittels PCR (Abb. 4-58).

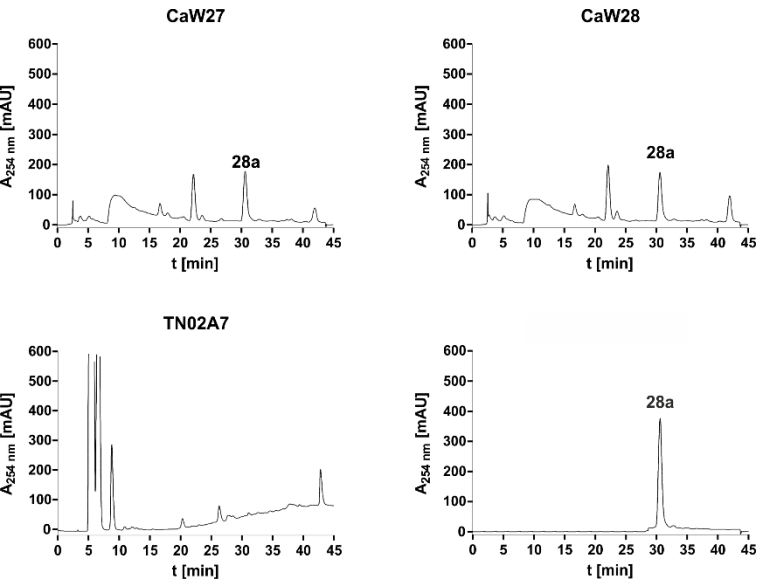


**Abb. 4-58: 1 %ige Agarosegele zur Überprüfung der genomischen DNA-Isolierung (A) und der Kontroll-PCR (B).** 1. Laufspur: DNA-Größenstandard; Laufspur 27 und 28 kennzeichnen den jeweiligen Transformanten CaW27 und CaW28; +: Postivkontrolle *A. nidulans* TN02A7.

AN9226-3/4	94 °C	94 °C	55°C	72°C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	60 s	60 s	7 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
AN9226	647	0,7

Die PCR zum Nachweis der genomischen Integration zeigte leider nicht das gewünschte Ergebnis, da für keinen der beiden Transformanten ein Fragment erhalten werden konnte.



**Abb. 4-59: HPLC-Chromatogramme der Kuturüberstände der Transformanten im Vergleich zum untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 jeweils nach 5 Tagen in AMM-Medium.** Sterigmatocystin (**28a**) diente als Standard.

Auch die Auswertung der Sekundärmetabolitproduktion mittels HPLC erbrachte lediglich die erneute Produktion von Sterigmatocystin (**28a**, Peak 31 min), sowie eines zusätzlichen Produktpeaks mit einer Retentionszeit von 22 min, der möglicherweise auch die Folge der Integration durch Aktivierung eines bisher inaktiven Sekundärmetabolitclusters ist (Abb. 4-59). Eine weitere Möglichkeit könnte

eine Kontamination des Pilzstammes sein, da das Wachstum der möglichen Transformanten nur sehr langsam auf entsprechenden Selektionsmedien voranschritt. Gegen diese Hypothese spricht allerdings die Tatsache der Wachstumsstagnation auf Selektionsmedium ohne jegliche

Zusätze. Während dieser Arbeit konnte die Identität dieser Transformanten und des zusätzlichen Produktes nicht abschließend geklärt werden.

### 4.2.3 Charakterisierung der putativen NRPS EAW25548 aus *N. fischeri*

Tab. 4-15: genetischer Kontext von *NFIA\_043670* auf dem Contig 568 (NW\_001509774.1)

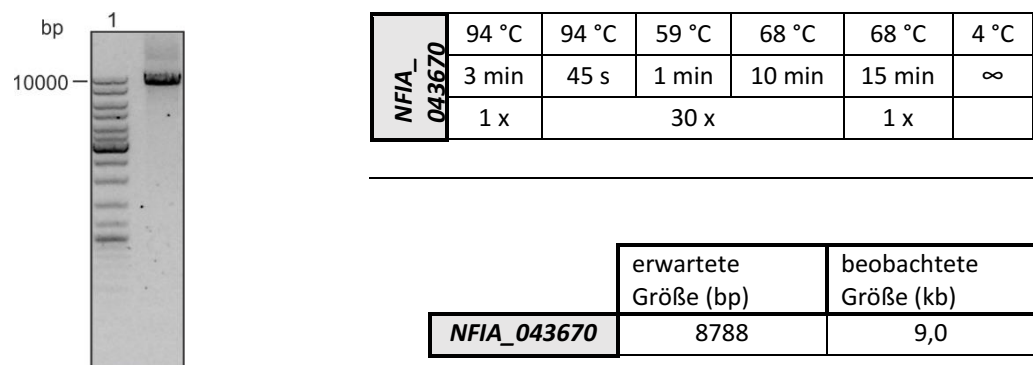
Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>NFIA_043610</i>	EAW25543	1751	12974-18485	Unbekanntes Protein
<i>NFIA_043620</i>	-	-	19289-19369	tRNA
<i>NFIA_043630</i>	EAW25544	437	20696-22534	Aminosäuren Transporter
<i>NFIA_043640</i>	EAW25545	609	23296-25373	Major Facilitator Superfamilie Transporter
<i>NFIA_043650</i>	EAW25546	445	30953-32343	C2-Prenyltransferase (CdpC2PT)
<i>NFIA_043660</i>	EAW25547	464	33178-34572	Aminooxidase
<b><i>NFIA_043670</i></b>	EAW25548	<b>2661</b>	<b>35719-43704</b>	<b>Nichtribosomale Peptidsynthetase</b>
<i>NFIA_043680</i>	EAW25549	750	47050-49455	Protein mit Zink-Finger-Domäne
<i>NFIA_043690</i>	EAW25550	690	49705-51777	Unbekanntes Protein
<i>NFIA_043700</i>	EAW25551	391	52505-53837	Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat-Aldolase
<i>NFIA_043710</i>	EAW25552	227	54895-55680	Glutathion S-Transferase Familienprotein
<i>NFIA_043720</i>	EAW25553	391	56571-58211	3-Deoxy-7-Phosphoheptulonatsynthase

Das NRPS-Gen *NFIA\_043670* aus *N. fischeri* NRRL 181 ist Bestandteil eines putativen, weitgehend uncharakterisierten Sekundärmetabolit-Clusters (Tab. 4-15). Aufgrund der biochemischen Charakterisierung der anliegenden Prenyltransferase CdpC2PT mit einer erhöhten Substratspezifität für *cyclo*-L-Trp-L-Trp, welches sowohl mono-, als auch diprenyliert werden kann, wird für EAW25548 die Biosynthese von *cyclo*-L-Trp-L-Trp und damit ihre Beteiligung an der Biosynthese von Fellutaninen postuliert (Kozlovsky *et al.*, 2000; Kozlovsky *et al.*, 2001; Mundt & Li 2013). *NFIA\_043670* befindet sich auf dem Contig 568 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NW\_001509774.1; 35719 bp – 43704 bp) mit einer vorhergesagten Größe von 7986 bp, welches einem putativen Genprodukt EAW25548 von 2661 Aminosäuren entspricht. Der Annotierung zur Folge besteht das Gen aus lediglich einem kodierenden Sequenzbereich. EAW25548 besitzt einen bimodularen Aufbau mit einer Domänenstruktur A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>C<sub>1</sub>A<sub>2</sub>MT<sub>2</sub>C<sub>2</sub>. Die Module besitzen jeweils eine Adenylierungs- (A),

Thioester- (T) und Kondensationsdomäne (C), welche für die Biosynthese eines Dipeptides, unter Umständen eines zyklischen Dipeptides stehen könnten. Durch die Methyltransferase-Modifikationsdomäne könnte auch die Inkorporation einer *N*-methylierten Aminosäure erfolgen. Nach dem Analyseverfahren des NRPSpredictor 2 sind beide Adenylierungsdomänen für die Integration von zwei hydrophob-aliphatischen Aminosäuren verantwortlich (Röttig *et al.*, 2011). Die erste Adenylierungsdomäne A<sub>1</sub> besitzt hierbei den NRPS-Code G-M-I-L-V-A-A-G-I-K und die zweite Adenylierungsdomäne A<sub>2</sub> D-A-L-F-C-G-S-V-V-K. Ein Vergleich jedoch mit anderen NRPS oder NRPS-like-Enzymen erbrachte für die erste Adenylierungsdomäne A<sub>1</sub> eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Aktivierung von Anthranilsäure (Ames & Walsh 2010; Kalb *et al.*, 2013). Für die zweite Adenylierungsdomäne A<sub>2</sub> konnten bisher keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden. Dennoch sind beide Postulate zur Spezifität hinsichtlich Tryptophan und Anthranilsäure denkbar, zumal CdpC2PT auch anthranilathaltige Dipeptide als Substrat akzeptiert (Mundt & Li 2013).

#### 4.2.3.1 Amplifikation des NRPS-Gens *NFIA\_043670* inklusive des-Promotor- und Terminatorbereiches

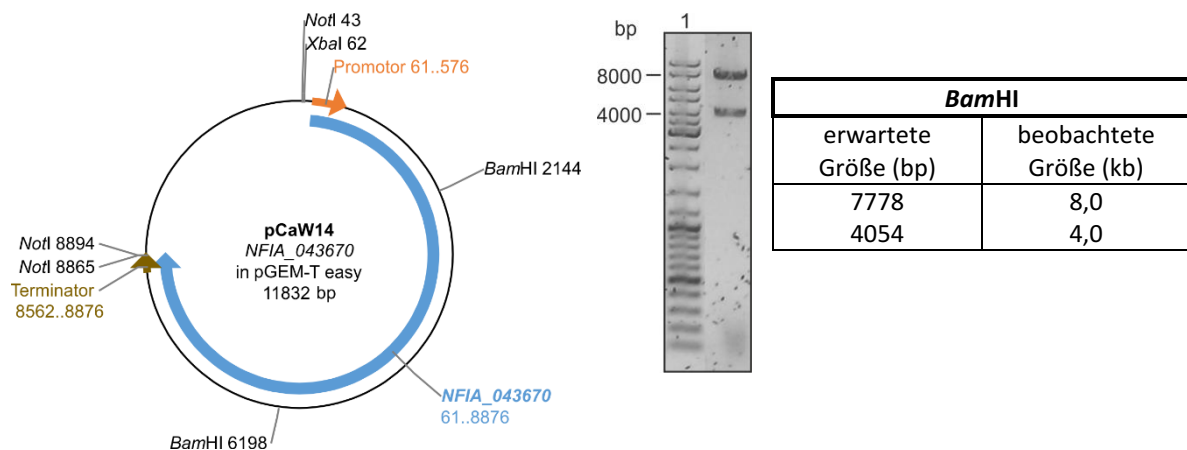
Für die Expression von *NFIA\_043670* in *A. nidulans* TN02A7 wurde der kodierende Bereich um 501 bp im 5'-Bereich und um 301 bp im 3'-Bereich erweitert, in der Annahme das damit sowohl der geneigene Promotor, als auch Terminator mitinbegriffen waren. Bisher gibt es keine adäquate Vorhersagemöglichkeit zur basengenauen Identifizierung von Promotoren und Terminatoren in Ascomyceten. Zur Amplifikation dieses Sequenzbereiches wurden die Primer CaW\_043670-1 und CaW\_043670-2 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) in Verbindung mit dem Expand Long Template PCR Kit (Roche) verwendet (Abb. 4-60).



**Abb. 4-60:** Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *NFIA\_043670* aus genomischer DNA. Laufspur 1: DNA-Größenstandard.

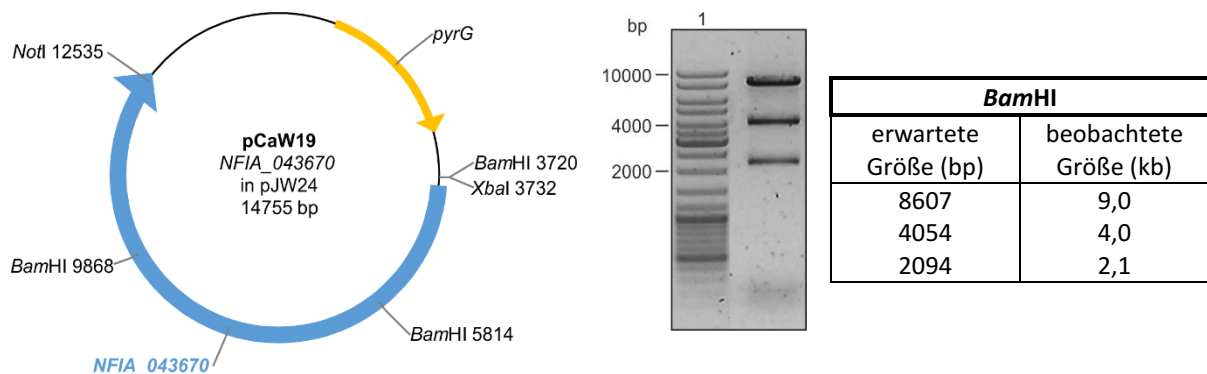
### 4.2.3.2 Klonierung und Transformation

Das erzeugte PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und in ultrakompetente *E. coli* XL10-Zellen eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die erhaltene Plasmid-DNA konnte durch einen *Bam*HI-Verdau auf seine Richtigkeit überprüft werden (Abb. 4-61).



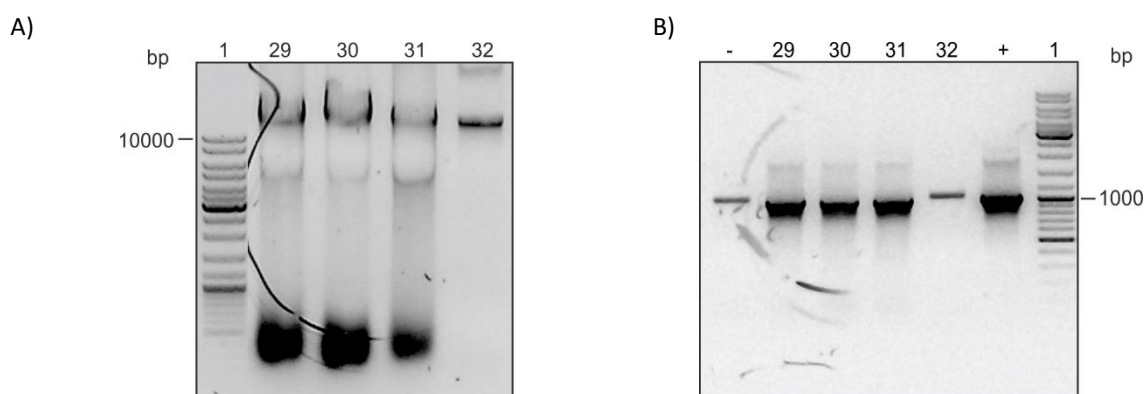
**Abb. 4-61: 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle von pCaW14 (NFIA\_043670 in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

Zur Erstellung des Transformationskonstruktes wurde aus pCaW14 mittels *Xba*I und *Not*I NFIA\_043670 entlassen und mit dem gleichermaßen behandelten Expressionsvektor pJW24 ligiert und ebenfalls in *E. coli* XL10 transformiert. Das erhaltene Plasmid pCaW19 wurde mittels *Bam*HI kontrolliert und bestätigt (Abb. 4-62).



**Abb. 4-62: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW19 (NFIA\_043670 in pJW24) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Dieses Plasmid wurde daraufhin für die Transformation von *A. nidulans* TN02A7 eingesetzt. Es konnten 4 Transformanten *A. nidulans* CaW29 - CaW32 (*NFIA\_043670*) erhalten werden, welche nach drei Selektionsrunden auf Uridin-/Uracil-freiem Medium zur Isolierung der genomischen DNA und Untersuchung der Sekundärmetabolitproduktion für 5 Tage kultiviert wurden. Für die Überprüfung der Transformanten erfolgte ein PCR-Nachweis (Abb. 4-63) unter Verwendung der Primerkombination 043670-3 und 043670-4 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6).



**Abb. 4-63: 0,8 %ige Agarosegele zur Überprüfung der genomischen DNA-Isolierung (A) und der Kontroll-PCR (B).** Laufspur 1: DNA-Größenstandard; Laufspur 29 - 32 kennzeichnen den jeweiligen Transformanten CaW29 – CaW32; Laufspur -: Negativkontrolle *A. nidulans* TN02A7; Laufspur +: Positivkontrolle *N. fischeri* NRRL 181.

043670-3/4	94 °C	94 °C	59°C	72°C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	60 s	90 s	7 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<b>NFIA_043670</b>	1000	1,0

Für 3 der 4 Transformanten konnte die Insertion des Genes ins Genom von *A. nidulans* TN02A7 erbracht werden. Lediglich Transformant *A. nidulans* CaW32 (*NFIA\_043670*) zeigte gemeinsam mit der Negativkontrolle, dem untransformierten *A. nidulans* TN02A7 ein höher laufendens PCR-Fragment als die anderen Transformanten und die Positivkontrolle *N. fischeri* NRRL 181. Bei der Auswertung der Sekundärmetabolitproduktion konnte auch hier ein Peak bei einer Retentionszeit von 31 min beobachtet werden, welcher als Sterigmatocystin (**28a**) mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden konnte (Anhang Abb. 7-43). Ein weiterer Peak wurde bei 22 min verzeichnet. Da dieser jedoch bei sämtlichen Transformanten auftrat, auch bei dem nach PCR negativen Transformanten *A. nidulans* CaW32 (*NFIA\_043670*) wurde dieser Peak bisher nicht näher analysiert. Er besitzt jedoch eine ähnliche Retentionszeit wie *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**) und wird möglicherweise durch andere Substanzen in seinem Laufverhalten beeinflusst. Als mögliches Produkt von EAW25548 wurde auch (*S*)-Benzodiazepindion (**1a**) als

Referenz mitgeführt, es konnte jedoch sein Vorhandensein in den Extrakten der Transformanten nicht bestätigt werden (Abb. 4-64).

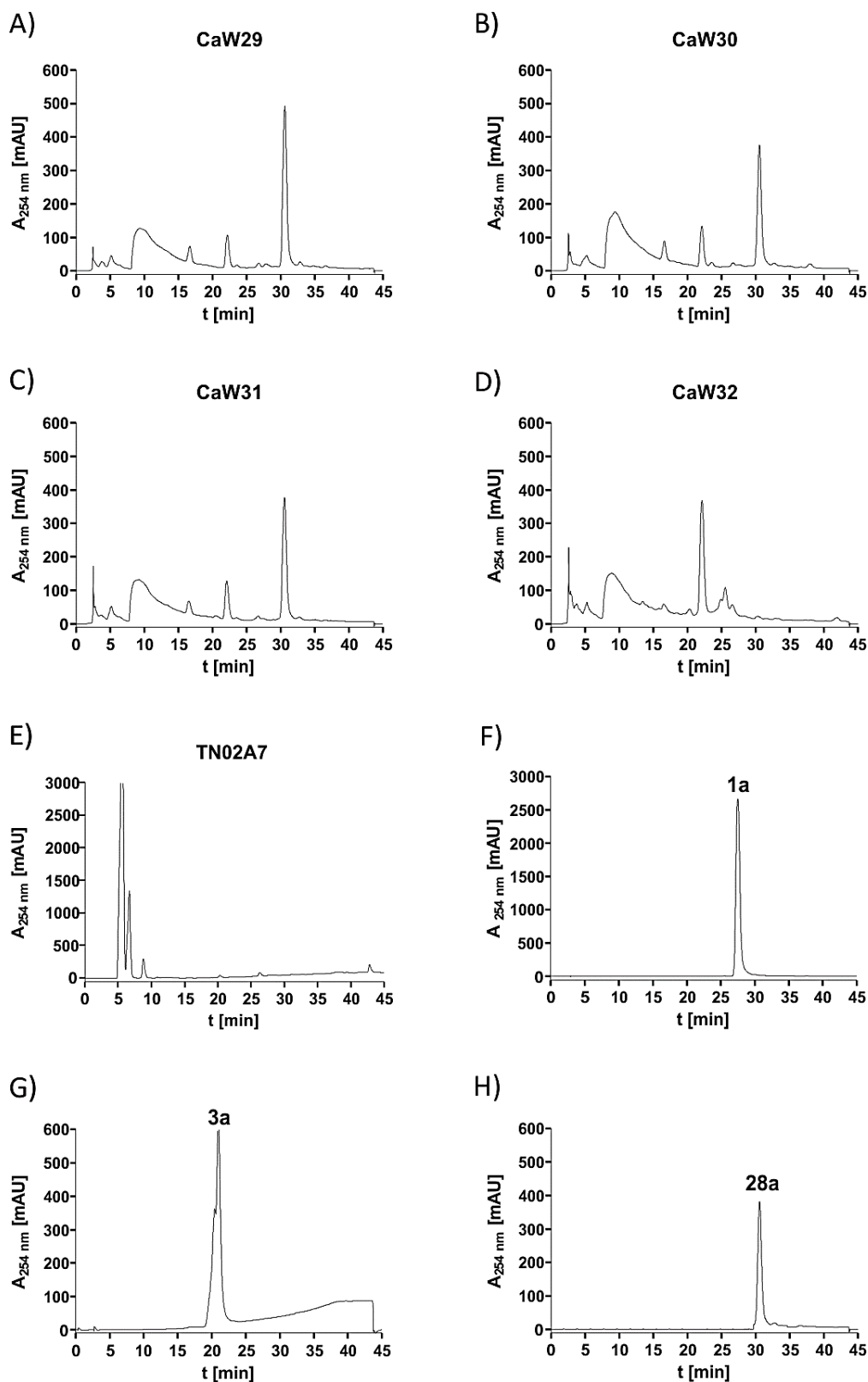
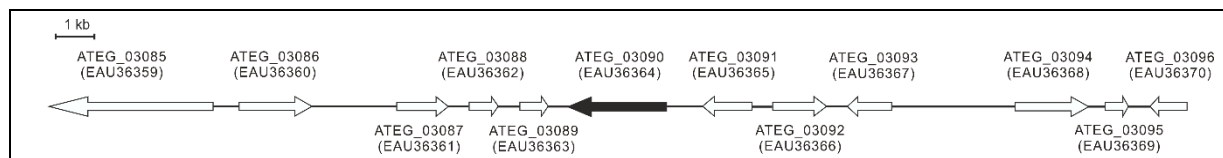


Abb. 4-64: HPLC-Chromatogramme der Kutfiltrate der Transformanten (A-D) im Vergleich zum untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 (E) jeweils nach 5 Tagen in AMM-Medium. (S)-Benzodiazepindion (1a; F) *cyclo*-L-Trp-L-Trp (3a; G) und Sterigmatocystin (28a; H) dienen als Referenzen.



## 4.2.4 Charakterisierung des putativen NRPS-ähnlichen Enzyms EAU36364 aus *A. terreus*

Tab. 4-16: genetischer Kontext von *ATEG\_03090* auf dem Supercontig 4 (NT\_165927.1)

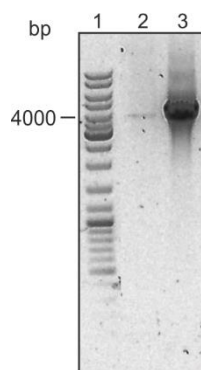


Gen	Protein	Größe (AS)	Lokalisation (bp)	putative Funktion
<i>ATEG_03085</i>	EAU36359	1315	839199-843408	Protein mit Signaltransduktionsdomäne
<i>ATEG_03086</i>	EAU36360	602	844058-845927	Protein zur Ribosomenbiogenese (40S)
<i>ATEG_03087</i>	EAU36361	315	848098-849422	Mitochondriales Carrier-Protein
<i>ATEG_03088</i>	EAU36362	248	849950-850696	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_03089</i>	EAU36363	224	851239-851965	Protein mit alpha/beta Hydrolase-Domäne
<i>ATEG_03090</i>	EAU36364	843	852504-855035	NRPS-ähnliches Enzym
<i>ATEG_03091</i>	EAU36365	334	855942-857206	O-Methyltransferase
<i>ATEG_03092</i>	EAU36366	444	857720-859105	Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie
<i>ATEG_03093</i>	EAU36367	378	859645-860781	Sin3-Bindeprotein / Translationsrepressor
<i>ATEG_03094</i>	EAU36368	575	863926-865816	CoA-Transferase
<i>ATEG_03095</i>	EAU36369	120	866241-866837	Unbekanntes Protein
<i>ATEG_03096</i>	EAU36370	147	867392-868340	Ribosomales Protein

Das NRPS-ähnliche Gen *ATEG\_03090* aus *A. terreus* DSM 1958 ist Bestandteil eines bisher uncharakterisierten Sekundärmetabolit-Clusters (Tab. 4-16). Es befindet sich auf dem Supercontig 4 (Sequenz in GenBank mit der Accession Nr. NT\_165927.1; 852504 bp – 855035 bp). Die vorhergesagte Größe beträgt 2532 bp, welches einem abgeleiteten Genprodukt EAU36364 von 843 Aminosäuren entspricht. Der Annotierung zur Folge besteht das Gen aus lediglich einem kodierenden Sequenzabschnitt. EAU36364 besitzt keinen modularen Aufbau, wie *AN9226* (Abschnitt 4.2.2) oder *NFIA\_043670* (Abschnitt 4.2.3). Es sind lediglich die Domänen A-T für Adenylierung und Thiolierung vorzufinden, jedoch keine bisher für diesen NRPS-Typus bekannten TE (Thioesterase)- oder R (Thioesterreduktase)-Domänen zur Freisetzung des Produktes. Dies spricht für die Beteiligung von weiteren Enzymen, welche eine Aktivierung und anschließende Verknüpfung eines zweiten Substrates über eine doppelte Claisen-Condensation, sowie die Freisetzung bzw. Übertragung des entstandenen Produktes ermöglichen. Vorhersagen zur Spezifität der Adenylierungsdomäne (Röttig *et al.*, 2011) sind jedoch aufgrund von signifikanten Unterschieden zu bereits bekannten NRPS und NRPS-ähnlichen Enzymen derzeit nicht möglich.

#### 4.2.4.1 Amplifikation von *ATEG\_03090* inklusive des-Promotor- und Terminatorbereiches

Um eine Expression von *ATEG\_03090* in *A. nidulans* TN02A7 zu ermöglichen, wurde der kodierende Bereich um 906 bp im 5'-Bereich und um 538 bp im 3'-Bereich erweitert, in der Annahme der Implementierung des geneigenen Promotors und Terminators. Bisher gibt es jedoch keine adäquate Vorhersagemöglichkeit zur basengenauen Identifizierung von Promotoren und Terminatoren in Ascomyceten. Zur Amplifikation dieses Sequenzbereiches wurden die Primer CaW\_03090-1 und CaW\_03090-2 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) in Verbindung mit dem Expand Long Template PCR Kit (Roche) verwendet (Abb. 4-65).



<i>ATEG_03090</i>	94 °C	94 °C	59 °C	68 °C	68 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	5 min	10 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

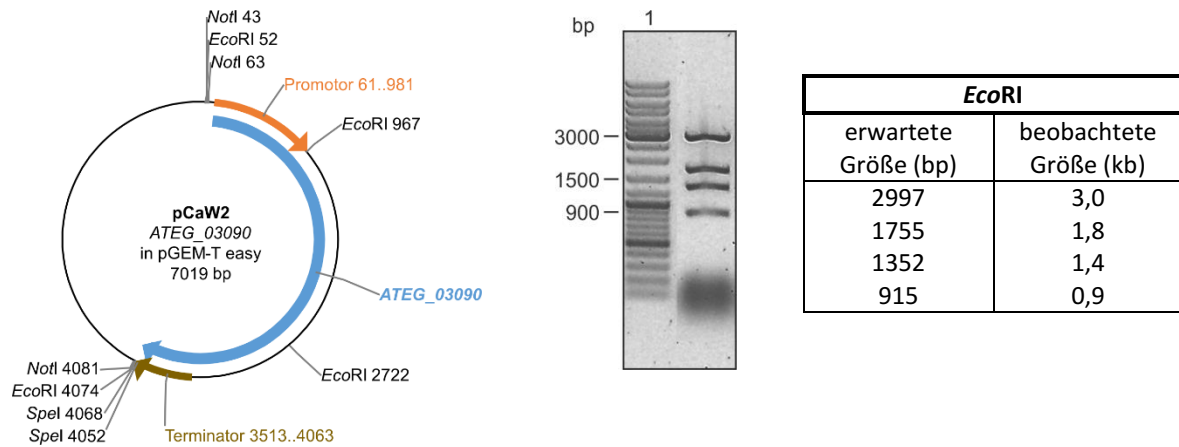
<i>ATEG_03090</i>	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
2	4002	4,0 (schwach)
3 (+BSA)	4002	4,0

**Abb. 4-65: Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *ATEG\_03090* aus genomischer DNA.** Laufspur 1: DNA-Größenstandard. Laufspur 2: PCR-Fragment (ohne Zusatz von BSA) Laufspur 3: PCR-Fragment mit Zusatz von 0,5 µg/µl BSA zum PCR-Ansatz.

Erst durch den Zusatz von 0,5 µg/µl BSA als PCR-Zusatz (Kreader 1996) konnte eine deutliche Steigerung der PCR-Effizienz und Ausbeute beobachtet werden.

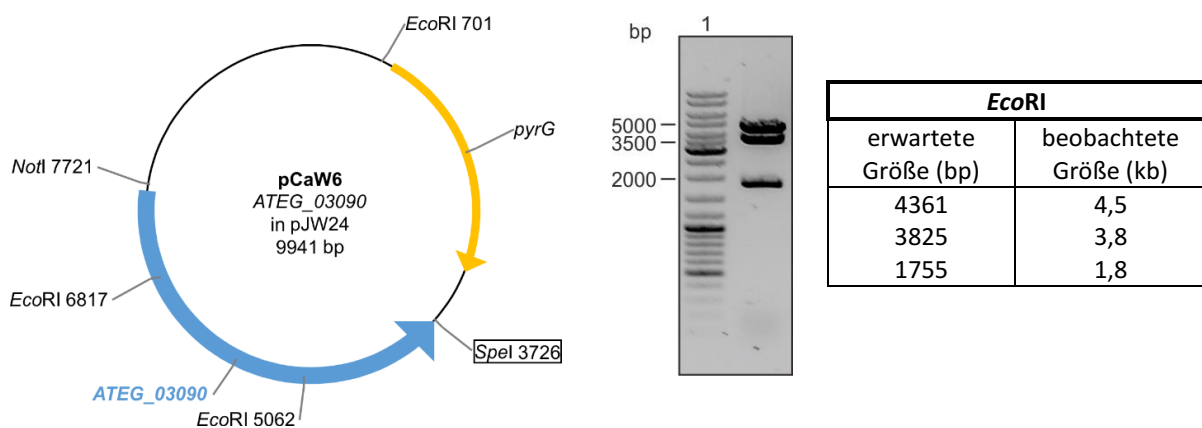
#### 4.2.4.2 Klonierung und Transformation

Das erzeugte PCR-Fragment konnte in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und in *E. coli* XL1-Blue MRF' eingebracht werden. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA diente ein *EcoRI*-Verdau (Abb. 4-66).



**Abb. 4-66: 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle von pCaW2 (ATEG\_03090 in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

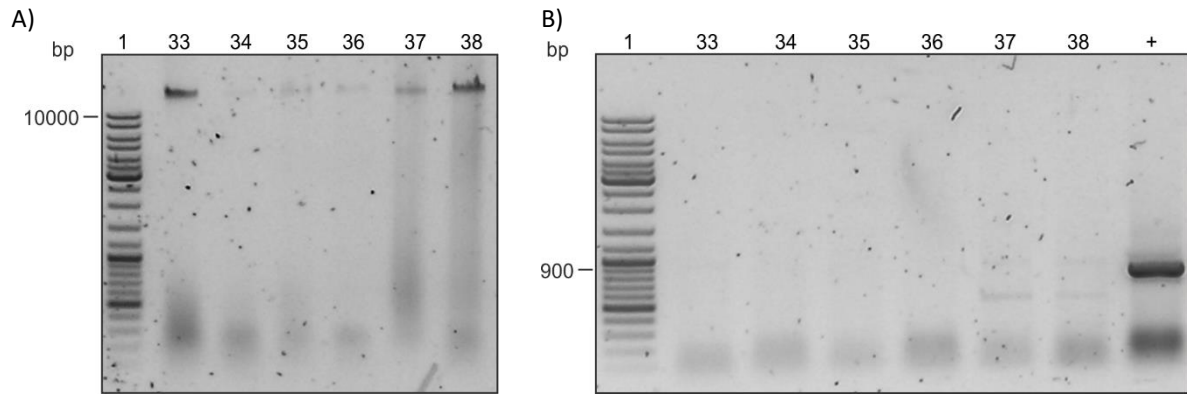
Zur Erstellung des Transformationskonstruktes wurde aus pCaW2 mittels *NotI* und *SpeI* ATEG\_03090 herausgeschnitten und mit dem *NotI/XbaI* behandelten Expressionsvektor pJW24 ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die fragmenteigene *SpeI*-Schnittstelle, sowie die *XbaI*-Schnittstelle des Zielvektors gingen dabei aufgrund der kompatiblen Enden verloren, spielen aber für weitere Arbeiten keine Rolle, zumal im Vektor an Position 3726 bp eine weitere *SpeI*-Schnittstelle verbleibt. Das erhaltene Plasmid pCaW6 konnte mittels erneutem *EcoRI*-Verdau kontrolliert und bestätigt werden (Abb. 4-67).



**Abb. 4-67: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW6 (ATEG\_03090 in pJW24) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Dieses Plasmid wurde daraufhin für die Transformation von *A. nidulans* TN02A7 eingesetzt. Es konnten insgesamt 16 Transformanten erhalten werden, welche nach drei Selektionsrunden auf Uridin-/Uracil-freiem Medium zur Isolierung der genomischen DNA kultiviert wurden. Für

die Überprüfung der Transformanten *A. nidulans* CaW33 - CaW48 (*ATEG\_03090*) erfolgte ein PCR-Nachweis unter Verwendung der Primerkombination CaW\_03090-1 und CaW\_03090-4 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6). Exemplarisch ist die Überprüfung der ersten 6 Transformanten dargestellt (Abb. 4-68).



**Abb. 4-68: 0,8 %ige Agarosegele zur Überprüfung der genomischen DNA-Isolierung (A) und der Kontroll-PCR (B).** Laufspur 1: DNA-Größenstandard; A) Laufspur 33 - 38 kennzeichnen den jeweiligen Transformanten CaW33 - 38; Laufspur +: Positivkontrolle *A. terreus* DSM 1958.

03090-1/ 03090-4	94 °C	94 °C	59°C	72°C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	60 s	90 s	7 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<i>ATEG_03090</i>	846	0,9 (+)

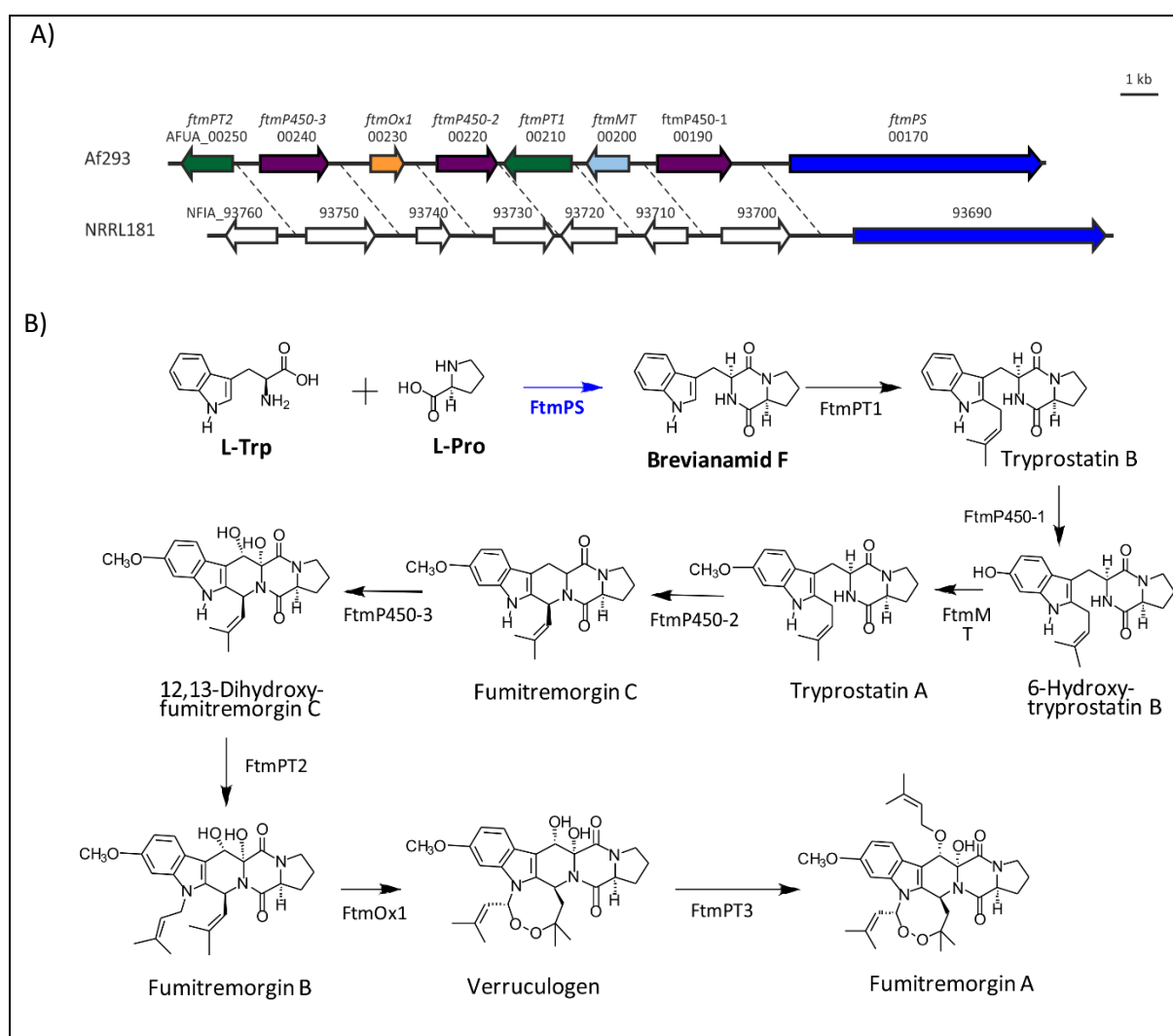
Es konnte leider für keinen Transformanten die Insertion von *ATEG\_03090* ins Genom von *A. nidulans* TN02A7 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde auch von einer Kultivierung zur Analyse der Sekundärmetabolitproduktion abgesehen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine positiven Transformanten für *ATEG\_03090* erhalten werden.

Durch weiterführende Sequenzanalysen hinsichtlich *ATEG\_03090* konnte ein möglicher erweiterter kodierender Bereich identifiziert werden. Der resultierende Leserahmen enthält laut Domänenstrukturanalyse eine putative Hydrolase-Domäne, welche bei der Abspaltung eines Produktes von EAU36364 eine Bedeutung haben könnte. Das abgeleitete Genprodukt hätte eine Größe von nun 887 Aminosäuren. Aufgrund des bereits implementierten Terminatorbereiches von 538 bp umfassen die erstellten Konstrukte bereits auch diesen erweiterten Sequenzbereich von *ATEG\_03090*. Dennoch bedarf es weiterer Transformationsversuche und Analysen der resultierenden Transformanten hinsichtlich der Sekundärmetabolitproduktion um die Funktion von EAU36364 aufzuklären.

#### 4.2.5 Zielgerichtete Produktion von Sekundärmetaboliten durch die Kombination der NRPS FtmPS und Prenyltransferasen in *Aspergillus*

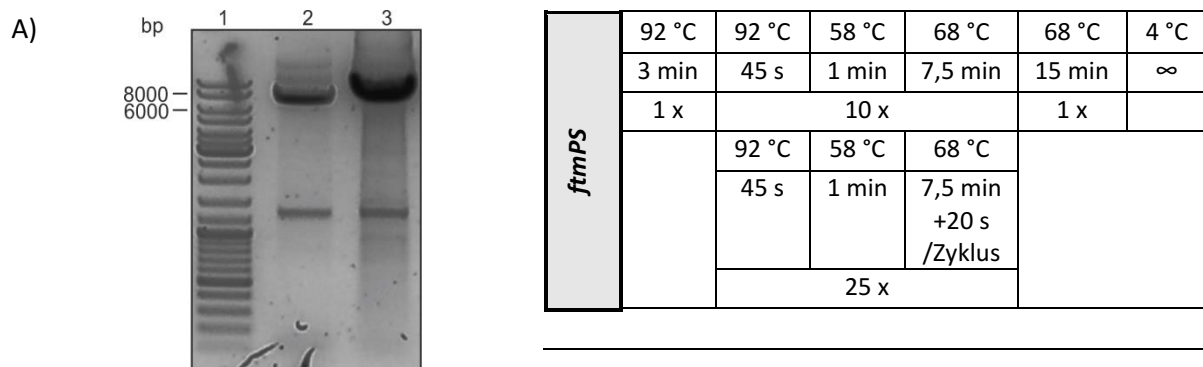
Das NRPS-Gen *ftmPS* aus *N. fischeri* NRRL 181 ist Bestandteil des Fumetremorgin-Biosynthesecusters (Abb. 4-69; B), welches vor einiger Zeit maßgeblich unter Mitwirkung unserer Arbeitsgruppe abschließend aufgeklärt werden konnte. Dazu zählen die Prenyltransferasegene *ftmPT1* und *ftmPT2* (Grundmann *et al.*, 2008; Grundmann & Li 2005), sowie das außerhalb des ursprünglichen Clusters befindliche Prenyltransferase-kodierende Gen *ftmPT3* (Mundt *et al.*, 2012). Weitere zugehörige Gene, kodierend für eine Dioxygenase *ftmOx1* (Steffan *et al.*, 2009b) und Methyltransferase *ftmMT*, sowie drei Cytochrome P450 kodierende Gene *ftmP450-1* -*ftmP450-3* sind ebenso an dieser Biosynthese beteiligt (Kato *et al.*, 2009). Das Gen *ftmPS* (NFIA\_093690) aus *N. fischeri* zeigt hierbei eine Sequenzidentität von 88 % auf Aminosäureebene zu seiner orthologen Entsprechung *ftmPS* aus *A. fumigatus* (Abb. 4-69; A) mit kongruenter modularer Struktur A<sub>1</sub>T<sub>1</sub>C<sub>1</sub>A<sub>2</sub>T<sub>2</sub>C<sub>2</sub>. Der Vergleich beider Aminosäuresequenzen der Adenylierungsdomänen anhand des Vorhersageprogrammes NRPSpredictor2 (Röttig *et al.*, 2011) erbrachte 10 spezifische Aminosäure, welche für die jeweiligen beiden Domänen identisch sind (A<sub>1</sub>: D-V-M-F-I-G-A-V-N-K, A<sub>2</sub>: D-V-Y-F-V-G-G-I-C-K) und demzufolge auch von der Aktivierung gleicher Aminosäuren auszugehen ist (Ames & Walsh 2010). Da *ftmPS* (auch *ftmA*) aus *A. fumigatus* Af293 sowohl alleine, als auch in Kombination mit *ftmPT1* in einem Konstrukt bereits erfolgreich exprimiert und charakterisiert wurde und sich für die Biosynthese von Brevianamid F (*cyclo*-L-Trp-L-Pro) bzw. Tryprostatin B verantwortlich zeigte (Maiya *et al.*, 2006; Maiya *et al.*, 2009), wurde der Entschluß zur Kombination mit Prenyltransferasegenen anderen Ursprungs gefasst. In dieser Arbeit sollte die Funktion des orthologe Gens *ftmPS* aus *N. fischeri*, in einem Konstrukt, in Kombination mit Prenyltransferasegenen in separaten Konstrukten in einem geeigneten *Aspergillus*-Stamm untersucht werden. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kathrin Mundt vier bereits *in vitro* charakterisierte Prenyltransferasegene ausgewählt. Zum einen die C2-Prenyltransferasegene *brePT* aus *A. versicolor* (Yin *et al.*, 2013a) und *cdpC2PT* aus *N. fischeri* (Mundt & Li 2013), sowie das C3-Prenyltransferasegene *cdpC3PT* (Yin *et al.*, 2010b) ebenso aus *N. fischeri* und *cdpNPT* aus *A. fumigatus* (Yin *et al.*, 2007). Mein Schwerpunkt lag dabei auf dem letzteren Prenyltransferasegen *cdpNPT*. Zur Optimierung der Expression von *ftmPS* und den Prenyltransferasegenen wurden die Transformationskonstrukte mit dem konstitutiven *gpdA* Promotor und *trpC* Terminator arrangiert (Punt *et al.*, 1991) und unter zusätzlicher

Insertion von Selektionsmarkern anschließend zur Komplementation im entsprechend auxotrophen *A. nidulans* TN02A7 verwendet. *A. nidulans* TN02A7 ist aufgrund von Mutationen in den Genen *pyrG* (Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase) und *pyroA* sowohl Uridin/Uracil-, als auch Pyridoxin-auxotroph. Unter dieser Voraussetzung wurden das *ftmPS*-Konstrukt mit *pyrG* und die Prenyltransferasegenkonstrukte mit *pyroA* zur Komplementation versehen. Es handelte sich hierbei um eine  $\text{Ca}^{2+}$ -PEG vermittelte Transformation der Protoplasten von *A. nidulans* TN02A7 (Ballance *et al.*, 1983; Bradshaw 2006; Tilburn *et al.*, 1983). Die Produktivität der erhalten Transformanten hinsichtlich Brevianamid F und der prenylierten Derivate wurde mittels HPLC analysiert und die Strukturaufklärung erfolgte via NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

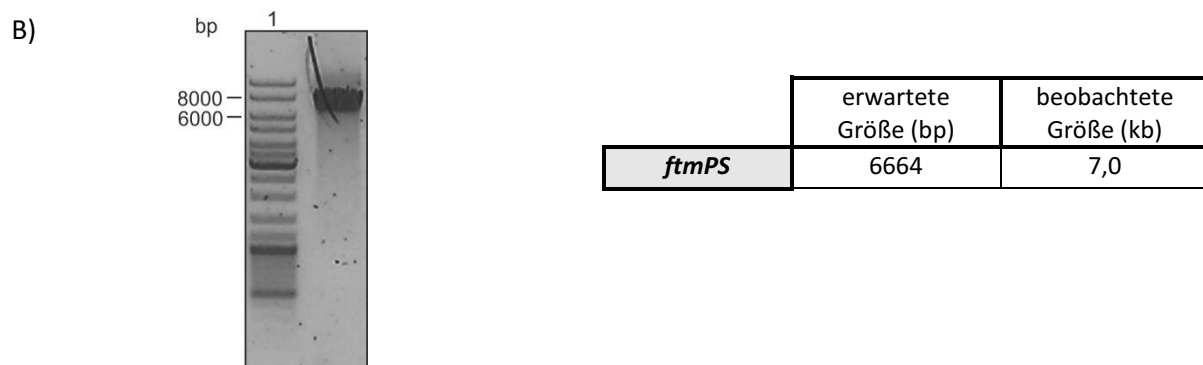


#### 4.2.5.1 Amplifikation des NRPS-Gens *ftmPS* mit transkriptionsfördernden Elementen

Zur Amplifikation von *ftmPS* wurden die Primer CaW\_ *ftmPS*-1 und CaW\_ *ftmPS*-2 (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) in Verbindung mit dem Expand Long Template PCR Kit (Roche) verwendet. Mit Hilfe einer Touchdown-PCR wurde ein Temperaturbereich eingegrenzt (Korbie & Mattek 2008) und anschließend zwei weitere PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen ( $T_a$ ) durchgeführt (Abb. 4-70; A).



<i>ftmPS</i>	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
2 ( $T_a$ : 56 °C)	6664	7,0 1,3
3 ( $T_a$ : 58 °C)	6664	7,0 1,3

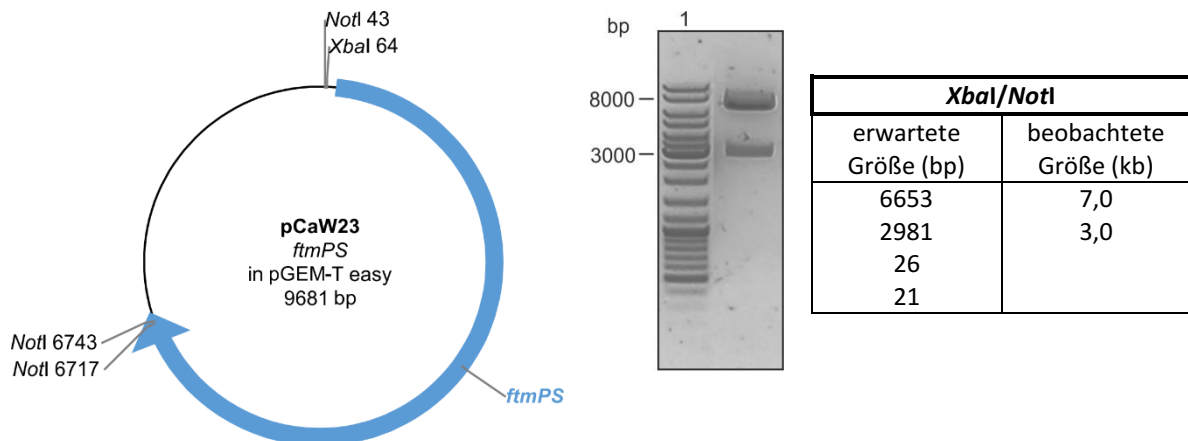


**Abb. 4-70:** A) Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *ftmPS* aus genomischer DNA. B) Agarosegel zur Überprüfung der Gelextraktion. Laufspur 1: DNA-Größenstandard. Laufspur 2:  $T_a$  56 °C, Laufspur 3:  $T_a$  59 °C.

Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation konnte jedoch auch ein unspezifisches Fragment mit einer Größe von etwa 1300 bp beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden beide Reaktionsansätze vereint und das gesuchte Fragment mit einer Größe von ca. 7000 bp über Gelextraktion erhalten und erneut überprüft (Abb. 4-70, B).

#### 4.2.5.2 Klonierung und Transformation

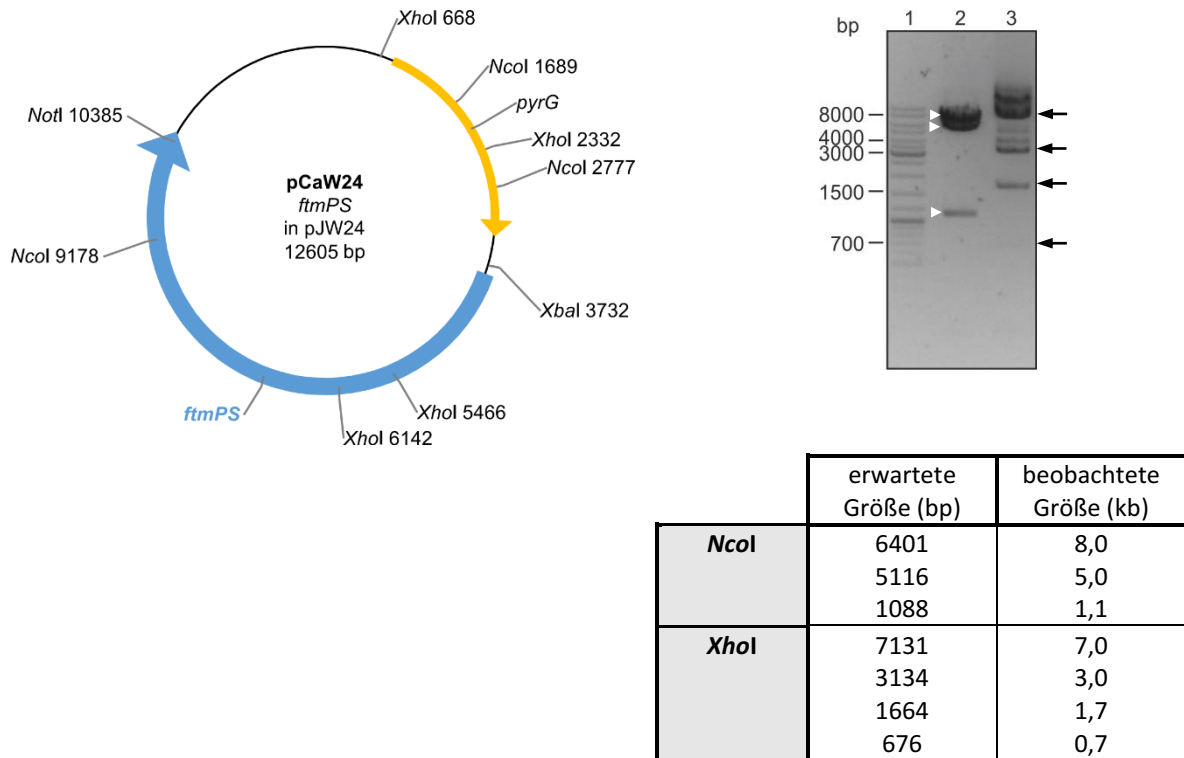
Das aufgereinigte PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy überführt und in ultrakompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen eingebracht. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die erhaltene Plasmid-DNA konnte durch einen *Xba*I/*Not*I-Doppelverdau auf seine Richtigkeit überprüft werden (Abb. 4-71).



**Abb. 4-71: 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle von pCaW23 (*ftmPS* in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind sowohl die zur Überprüfung, als auch die zur Umklonierung in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

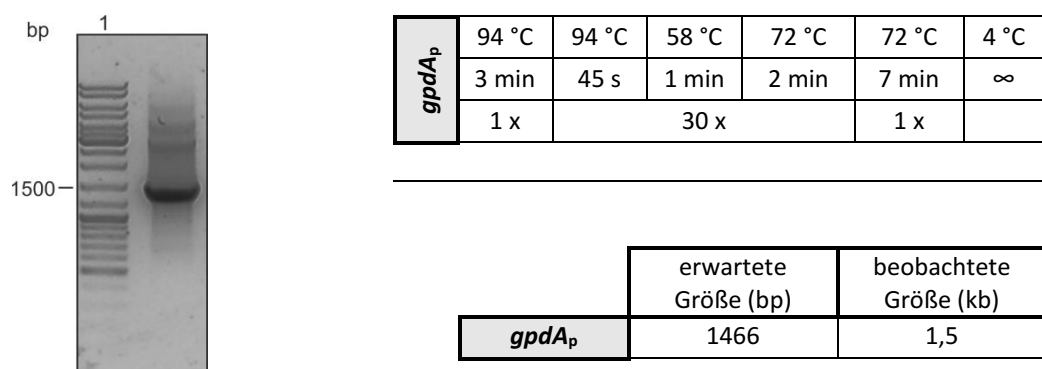
Zur Erstellung des Transformationskonstruktes wurde *ftmPS* aus pCaW23 mittels *Xba*I und *Not*I entfernt und mit dem gleichermaßen behandelten Expressionsvektor pJW24 ligiert und ebenfalls in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Das erhaltene Plasmid pCaW24 wurde mittels *Nco*I und *Xho*I kontrolliert und bestätigt (Abb. 4-72).





**Abb. 4-72:** 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle von pCaW24 (*ftmPS* in pJW24) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

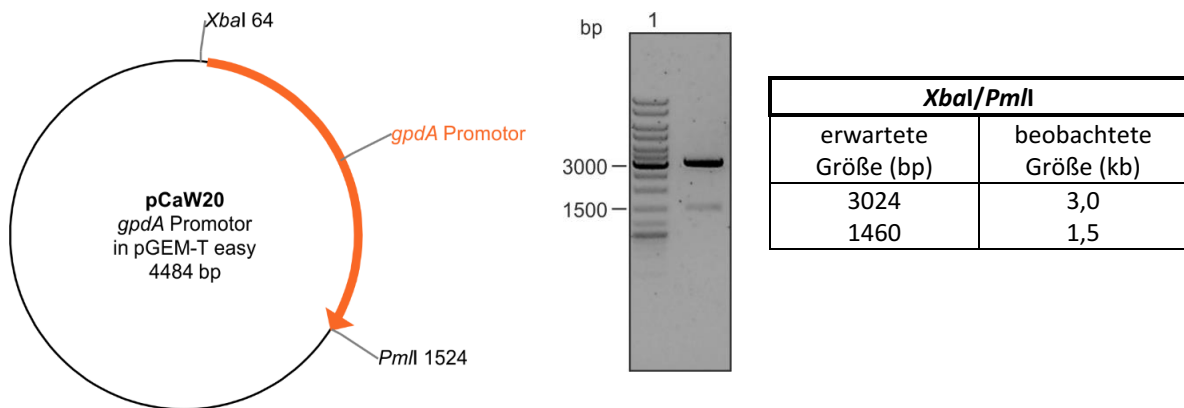
Dieses Plasmid wurde daraufhin um den artifiziiellen *gpdA* Promotor (*gpdA<sub>p</sub>*) erweitert. Vorhergehend wurde dazu *gpdA<sub>p</sub>* aus dem bestehenden Konstrukt pCaW3 mittels PCR mit den benötigten Schnittstellen *XbaI* und *PmlI* versehen (Primer: CaW\_*gpdApftmA*-1, CaW\_*gpdApftmA*-2; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6; Abb. 4-73).



**Abb. 4-73:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *gpdA<sub>p</sub>* aus pCaW3. 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

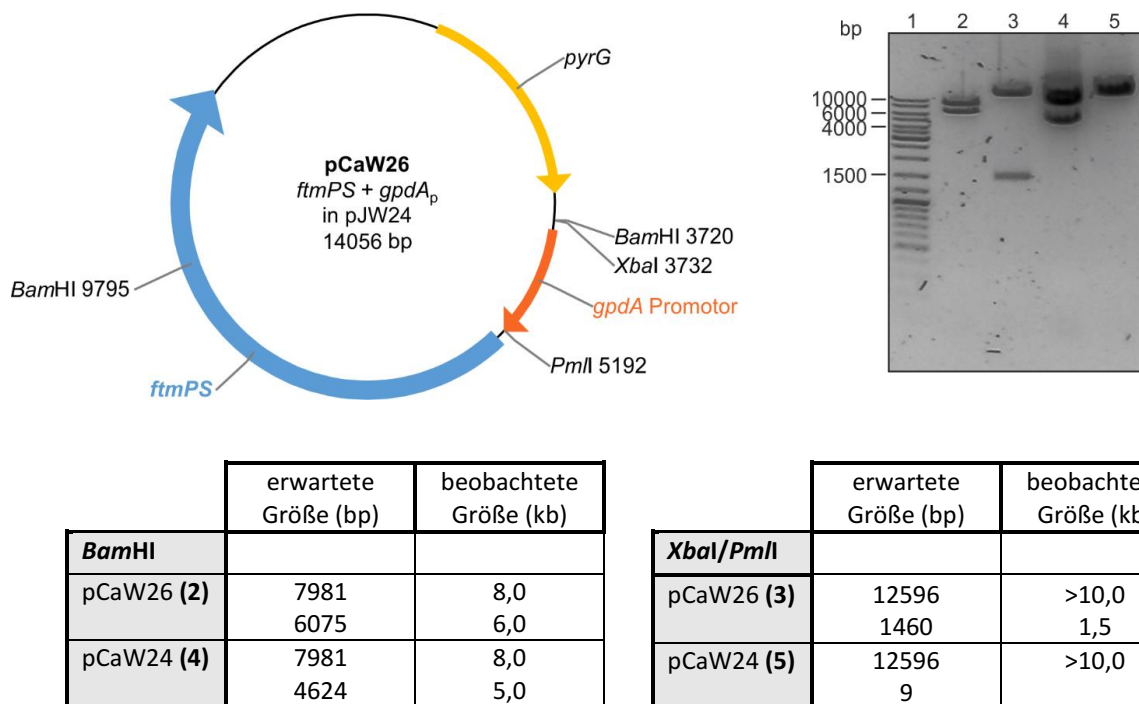
Anschließend konnte in pGEM-T easy ligiert und in ultrakompetente *E. coli* DH5α transformiert werden. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur

Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die erhaltene Plasmid-DNA konnte durch einen *Xba*I/*Pml*I-Doppelverdau auf seine Richtigkeit überprüft werden (Abb. 4-74).



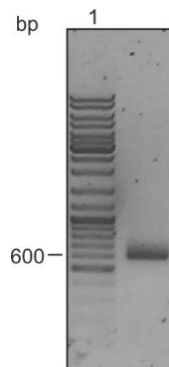
**Abb. 4-74:** 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle von pCaW20 (*gpdA*<sub>p</sub> in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Dieses Zwischenkonstrukt diente nun der Überführung von *gpdA*<sub>p</sub> in pCaW24 über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Pml*I. Das Plasmid wurde ebenfalls in ultrakompetente *E. coli* DH5α verbracht und durch vergleichende Restriktionsanalysen mit dem Zielvektor pCaW24 durch *Bam*HI und *Xba*I/*Pml*I verifiziert (Abb. 4-75).



**Abb. 4-75:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW26 (*gpdA*<sub>p</sub> in pCaW24) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Weiterführend wurde das Konstrukt um eine Terminatorregion von einem Gen aus der Tryptophanbiosynthese von *A. nidulans* erweitert, den *trpC* Terminator (*trpC<sub>term</sub>*). Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe der Primerkombination CaW\_trpCftmA-1 und CaW\_trpCftmA-2, welche zur Insertion der benötigten *NotI*-Schnittstellen beitrugen (Abb. 4-76).

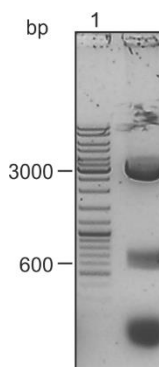
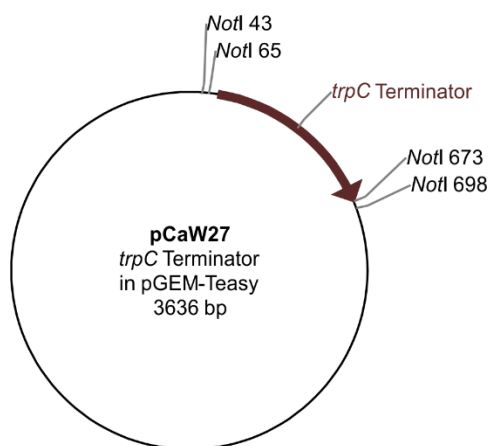


<i>trpC<sub>term</sub></i>	94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	1 min	7 min	∞
	1 x	30 x			1 x	

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<i>trpC<sub>term</sub></i>	1466	1,5

**Abb. 4-76:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *trpC<sub>term</sub>* aus genomischer DNA von *A. nidulans* FGSC A4. 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

Daraufhin erfolgte die Klonierung in pGEM-T-easy und die Transformation in *E. coli* DH5α. Nach Blau-Weiß-Selektion positive Klone wurden zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde mittels *NotI* Restriktionsverdau überprüft (Abb. 4-77).

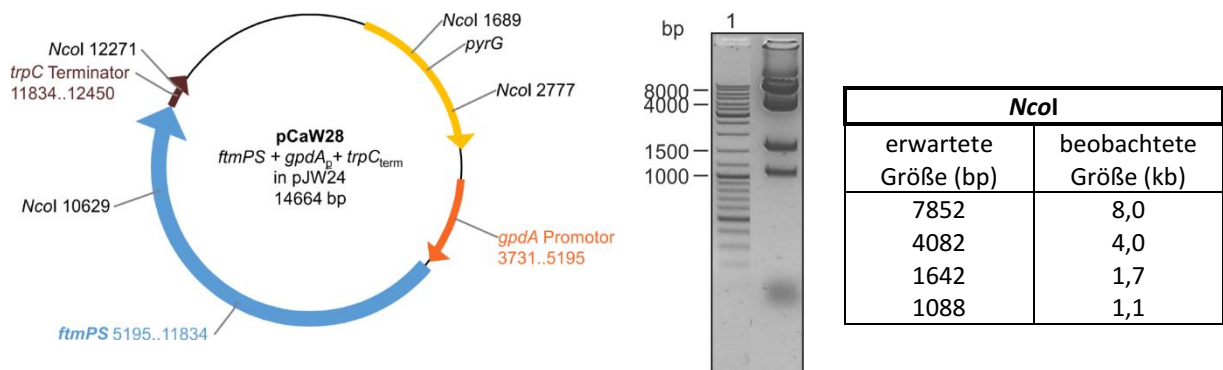


<i>NotI</i>	
erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
2981	3,0
608	0,6
25	
22	

**Abb. 4-77:** 0,8 %iges Agarosegel zur Kontrolle von pCaW27 (*trpC* Terminator in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

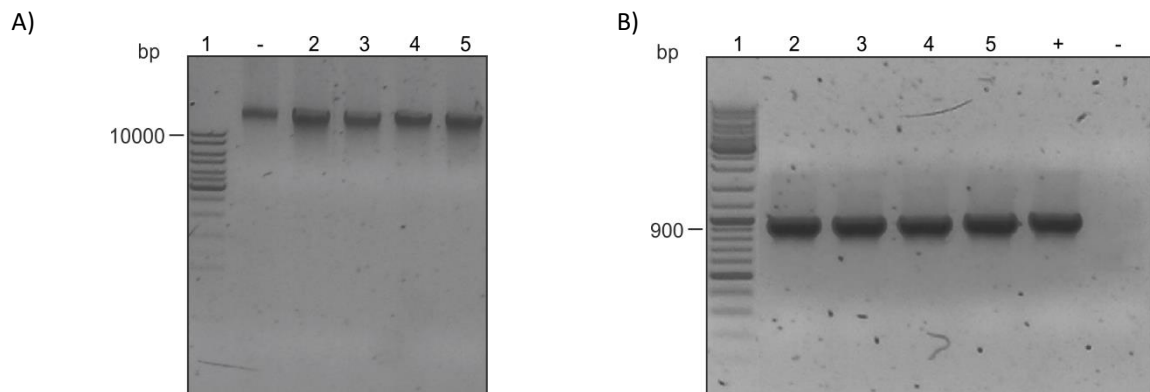
Zur Vervollständigung des Transformationskonstruktes wurde der *trpC* Terminator (*trpC<sub>term</sub>*) in pCaW26 integriert. Dazu erfolgte das Herausschneiden des *trpC* Terminators aus pCaW27 mittels *NotI* und die Insertion in den ebenso geöffneten Zielvektor pCaW26. Das neu

entstandene Plasmid pCaW28 wurde wiederum in *E. coli* DH5 $\alpha$  überführt und konnte mittels *Nco*I-Verdau bestätigt werden (Abb. 4-78).



**Abb. 4-78:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW28 (*ftmPS* + *gpA<sub>p</sub>* + *trpC<sub>term</sub>* in pJW24) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Das erhaltene Restriktionsmuster gibt auch Aufschluss über die korrekte Orientierung vom Terminatorbereich, da durch die interne Schnittstelle bei umgekehrter Insertion die Fragmentierung 7852 bp, 4344, 1380 und 1088 die Folge wäre. Nach erfolgreicher Komplettierung des *ftmPS*-Konstruktes wurde dieses für die Transformation von *A. nidulans* TN02A7 eingesetzt (Abb. 4-79).

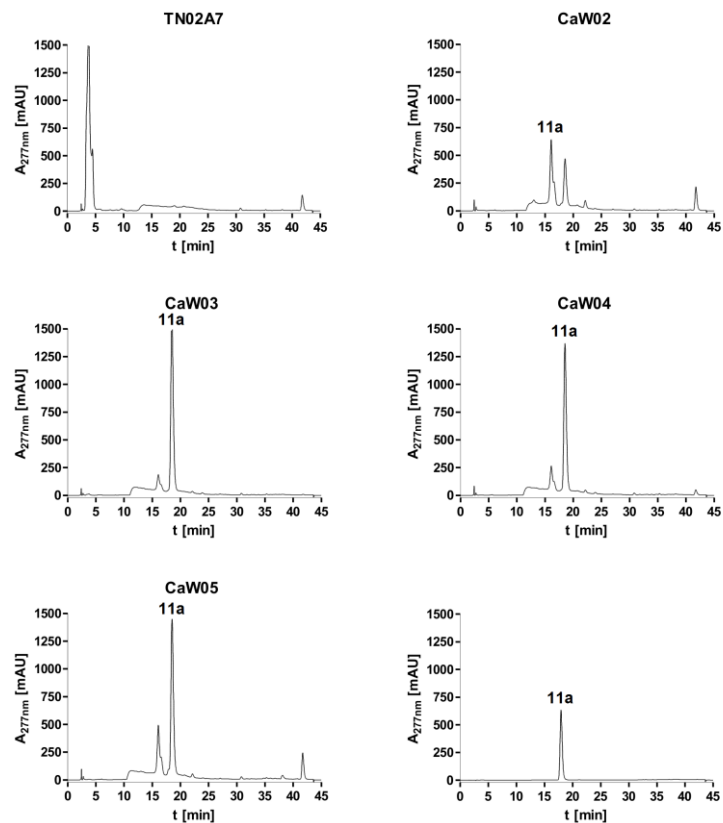


**Abb. 4-79:** 1 %ige Agarosegele zur Überprüfung der genomischen DNA-Isolierung (A) und der Kontroll-PCR (B). Laufspur 1: DNA-Größenstandard; A) Laufspur -: *A. nidulans* TN02A7; Laufspur 2 - 5 kennzeichnen den jeweiligen Transformanten CaW02 – CaW05; Laufspur +: Positivkontrolle *N. fischeri* NRRL 181, Laufspur -: Negativkontrolle *A. nidulans* TN02A7

<i>ftmPS1</i> / <i>ftmPS<sub>rv2</sub></i>	94 °C	94 °C	59 °C	72 °C	72 °C	4 °C
	3 min	45 s	60 s	90 s	7 min	∞
	1 x	35 x			1 x	

<i>ftmPS</i>	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
	915	0,9

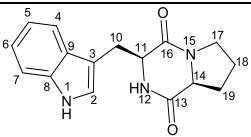
Es konnte für alle 4 Transformanten *A. nidulans* CaW02-05 (*ftmPS*) der positive Nachweis der Integration mittels PCR erbracht werden (Primerkombination CaW\_ftmPS-1 und CaW\_ftmPS\_rv2; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) und diese für die Kultivierung zur Analyse der Sekundärmetabolitproduktion verwendet werden. Weiterführend wurden die Transformanten in Aspergillus-Minimalmedium mit den notwendigen Zusätzen kultiviert, anschließend das Kulturfiltrat mit Ethylacetat extrahiert, der



**Abb. 4-80: HPLC-Chromatogramme der Sekundärmetabolitproduktion der *ftmPS*-Transformanten *A. nidulans* CaW02-05 (*ftmPS*).**

Extrakt eingengt und mittels HPLC analysiert (Abb. 4-80). Sämtliche Transformanten zeigten bei einer Retentionszeit von 18 min einen identischen Produktpeak, welcher im HPLC-Chromatogramm der Referenz *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**11a**) ebenfalls zu verzeichnen war, jedoch nicht beim untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7. Lediglich hinsichtlich der Intensitäten konnten Unterschiede zwischen den Transformanten ausgemacht werden. Aufgrund der höchsten Produktbildung im Falle von Transformant *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) wurde dieser ausgewählt zur Isolierung und Strukturaufklärung des entsprechenden Produktes.

**Tab. 4-17:  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von *cyclo*-L-Trp-L-Pro und des Isolats (Peak 18 min Retentionszeit).** Das Spektrum wurde an einem JEOL ECA-500 Spektrometer aufgenommen. Chemische Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in ppm und Kopplungskonstanten in Hz angegeben.

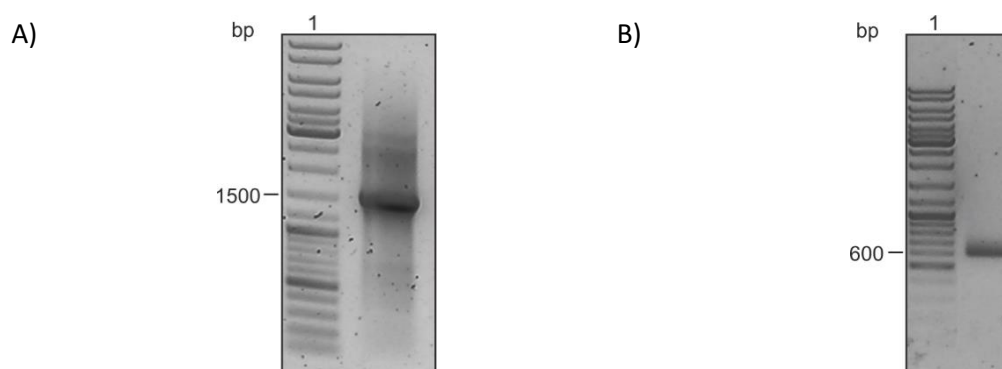
			
	<b><i>cyclo</i>-L-Trp-L-Pro</b> (Grundmann & Li 2005) $\delta_{\text{H}}$ , multi., J in Hz	<b><i>cyclo</i>-L-Trp-L-Pro</b> (synthetisiert von L. Ludwig) $\delta_{\text{H}}$ , multi., J in Hz	<b>Isolat <i>A. nidulans</i> CaW03</b> <b>(11a)</b> $\delta_{\text{H}}$ , multi., J in Hz
Proton	$\text{CDCl}_3$	$\text{CD}_3\text{OD}$	$\text{CD}_3\text{OD}$
<b>NH1</b>	8,15 br s	-	-
<b>2</b>	7,10; d; 2,0	7,10; s	7,10; s
<b>4</b>	7,57; d; 7,8	7,57; dt; 8,0; 1,0	7,58; dt; 8,0; 0,9
<b>5</b>	7,14; td, 7,2; 1,1	7,01; td; 7,6; 1,0	7,01; td; 7,6; 1,0
<b>6</b>	7,22; td, 7,2, 1,2	7,09; td; 7,6; 1,1	7,09; td; 7,6; 1,1
<b>7</b>	7,38; d; 8,1	7,33; d; 8,0	7,33; d; 8,1
<b>10a</b>	2,95; dd; 15,1; 10,9;	3,25; ddd; 15,0; 10,5; 3,5	3,27; ddd; 15,0; 10,5; 3,5
<b>10b</b>	3,75; ddd; 15,1; 3,0; 0,6	3,45; ddd; 15,0; 3,5; 0,8	3,46; ddd; 15,0; 3,5; 0,8
<b>11</b>	4,36; dd; 11,0; 2,8	4,40; dd; 10,5; 1,8	4,42; dd; 10,5; 1,8
<b>NH12</b>	5,68 br s	-	-
<b>14</b>	4,06; t; 7,6	3,96; ddd; 10,9; 6,4; 1,8	4,00; ddd; 10,9; 6,4; 1,7
<b>17</b>	3,63; m	3,33; m	3,33; m
<b>18</b>	1,91; m	1,47; m	1,48; m
		0,95; m	0,94; m
<b>19</b>	2,30; m	1,96; m	1,97; m
	1,99; m	1,67; m	1,68; m

Hierbei waren Abweichungen bei den chemischen Verschiebungen der Protonen gegenüber der Referenz (Grundmann & Li 2005) erkennbar (Tab. 4-17), die aber vermutlich auf die Verwendung eines unterschiedlichen Lösungsmittels zurückzuführen sind (Anhang Kapitel 7.6 Abb. 7-45), daher erfolgte ein Vergleich der Daten mit einer weiteren Referenz im gleichen Lösungsmittel (Tab. 4-17). Demnach zeigen die Angaben nahezu vollständige Übereinstimmung und der Erhalt von *cyclo*-L-Trp-L-Pro konnte somit bestätigt werden. Auch die massenspektrometrischen Daten  $m/z = 283,13$  stimmten ebenfalls mit den errechneten Werten überein (Anhang Abb. 7-46). Die Produktivität des Transformanten CaW03 wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt und befand sich bei errechneten 36,9 mg/l Kultur. Aufgrund der im Vergleich höchsten Produktion an Brevianamid F wurde dieser Transformant auch für die Kombination mit den Prenyltransferasegenen *brePT*, *cdpC2PT*, *cdpC3PT* und *cdpNPT* ausgewählt.

#### 4.2.5.3 Modifikation von pHL5 mit transkriptionsfördernden Elementen für die Verwendung in *Aspergillus*

Der Vektor pHL5 (Yin *et al.*, 2007) beinhaltet das Prenyltransferasegen *cdpNPT* im Vektor pQE-60. Dieses Vektorsystem ist hierbei für die Verwendung in *E. coli* optimiert, die potentiell in der Lage sind das T5 Promotor Translations-Transkriptionssystem zu verwenden. Aufgebaut ist dieses aus dem T5-Phagen-Promotor, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt werden kann, einer synthetischen Ribosomenbindestelle (RBS), dem Polylinker, einem Histidin-*tag* und 2 Terminatoren, einem Phagen - (*t<sub>0</sub>*) und einem *E. coli*-Terminator (T1). Dieses bakterielle System wurde daraufhin durch ein eukaryotisches System ersetzt. Es wurden hierbei der konstitutive *gpdA* Promotor und *trpC*-Terminator aus *A. nidulans* verwendet (Punt *et al.*, 1991). Weiterhin verfügt diese Plasmid nicht über einen geeigneten Selektionsmarker für *Aspergillus nidulans* TN02A7. Zur Komplementation der Pyridoxin-Auxotrophie von *A. nidulans* TN02A7 wurde *pyroA* ausgewählt. Demzufolge wurde das Konstrukt um diesen Selektionsmarker erweitert.

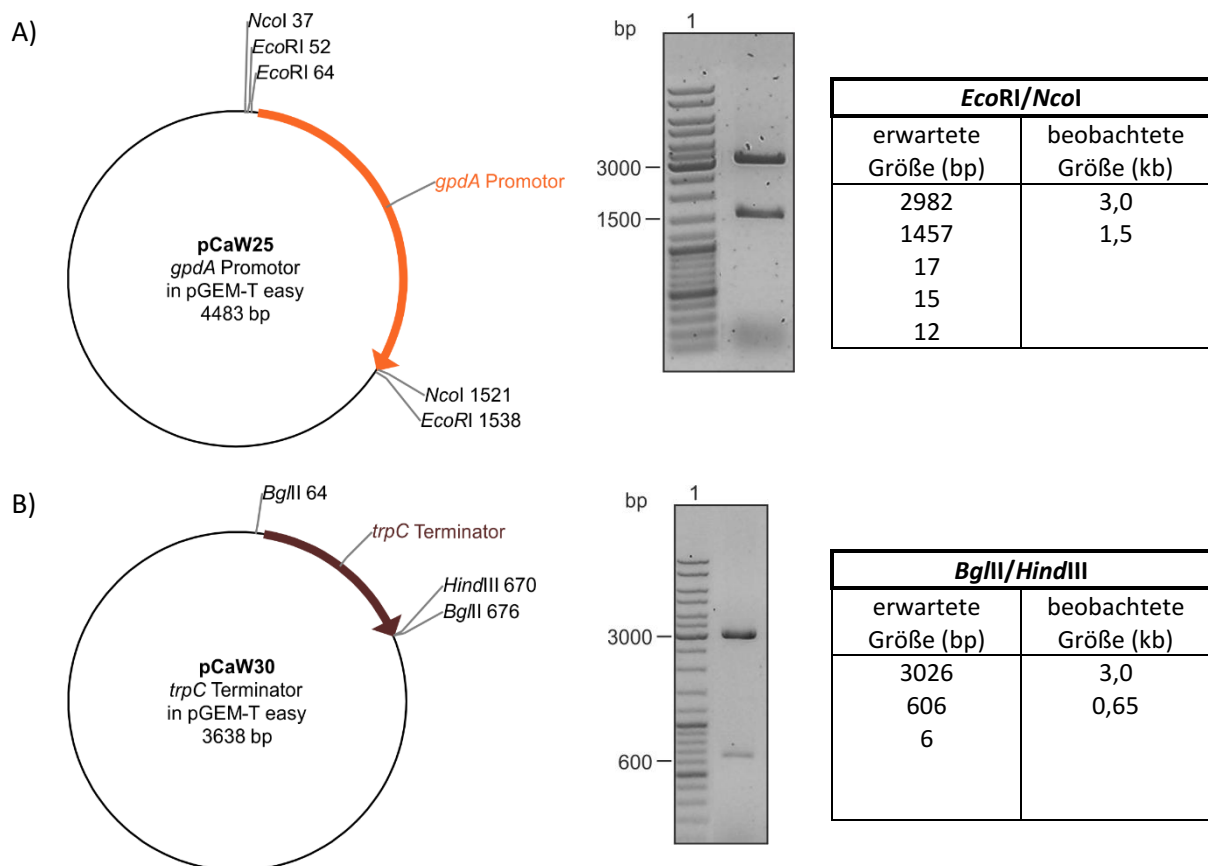
In einem ersten Schritt wurde hierfür analog zur Konstruktion des *ftmPS*-Konstruktes verfahren und sowohl der *gpdA* Promotor (*gpdA<sub>p</sub>*) mittels PCR mit den erforderlichen Schnittstellen *EcoRI* und *NcoI* (Primer: CaW\_*gpdAp*PT-1, CaW\_*gpdAp*PT-2; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6), sowie der *trpC* Terminator (*trpC<sub>term</sub>*) mit den Schnittstellen *BglII* und *HindIII* durch die Primerkombination CaW\_*trpC*PT-1, CaW\_*trpC*PT-2; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) versehen (Abb. 4-81).



	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)		erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<b><i>gpdA<sub>p</sub></i></b>	1466	1,5	<b><i>trpC<sub>term</sub></i></b>	621	0,65

**Abb. 4-81:** Agarosegele der PCR-Amplifikation von A) *gpdA<sub>p</sub>* aus pCaW3 und B) *trpC<sub>term</sub>* aus genomischer DNA. 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

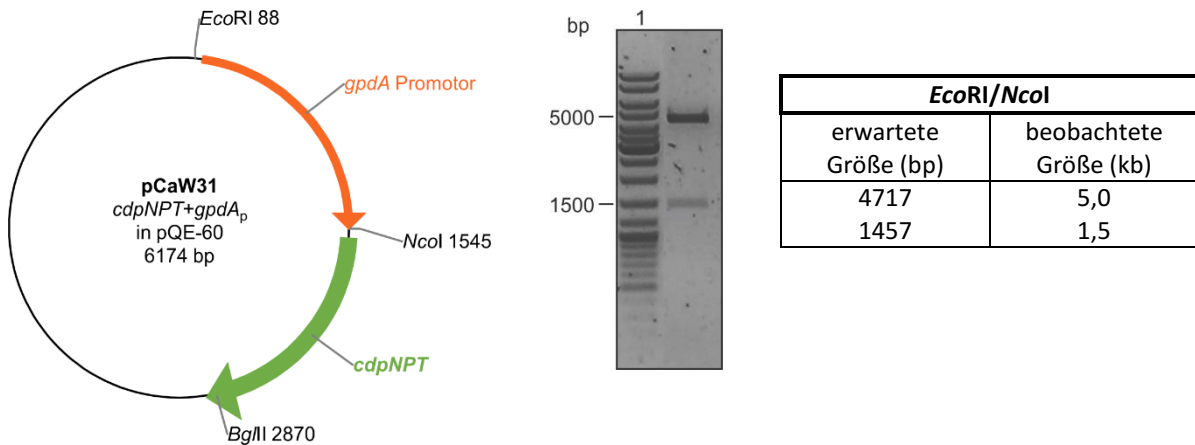
Anschließend erfolgte die Ligation in den Klonierungsvektor pGEM-T easy und in chemokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>'</sup>(*gpdA<sub>p</sub>*) oder *E. coli* DH5α (*trpC<sub>term</sub>*) transformiert. Über Blau-Weiß-Selektion wurden potentiell positive Klone identifiziert und zur Plasmidisolierung weiterkultiviert. Die isolierte Plasmid-DNA konnte durch einen *EcoRI*/*NcoI*-Doppelverdau für *gpdA<sub>p</sub>* und einen *BglII*/*HindIII*-Restriktionsansatz für *trpC<sub>term</sub>* verifiziert werden (Abb. 4-82).



**Abb. 4-82:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von A) pCaW25 (*gpdA<sub>p</sub>* in pGEM-T easy) und B) pCaW30 (*trpC<sub>term</sub>* in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

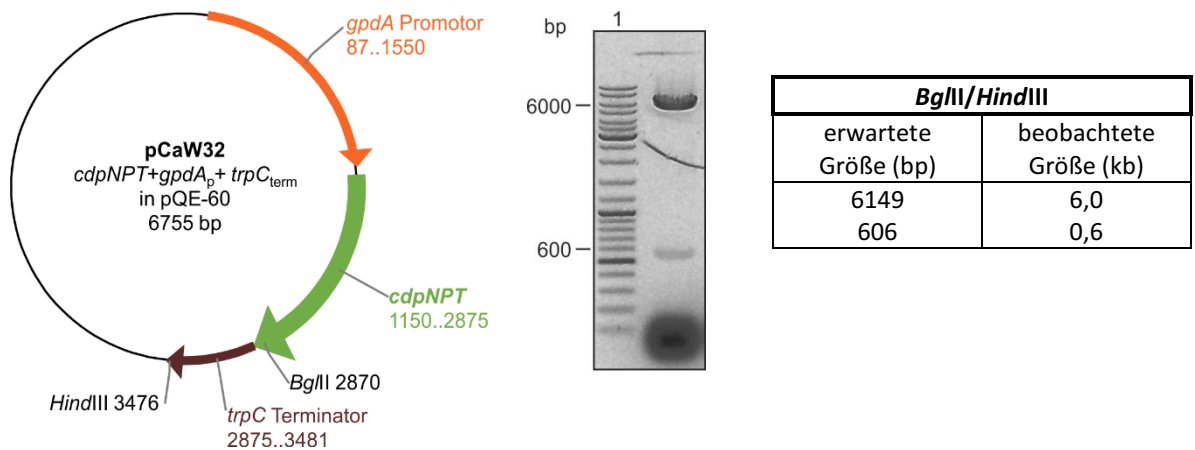
Sequentiell wurden der *gpdA* Promotor und der *trpC* Terminator mit *cdpNPT* in einem Konstrukt arrangiert. Als erstes erfolgte die Integration von *gpdA<sub>p</sub>* in pHL5 über die Schnittstellen *EcoRI* und *NcoI*. *E. coli* DH5α diente hierbei als Zielorganismus der Transformation. Die erhaltene Plasmid-DNA pCaW31 wurde isoliert und einer Kontrollrestriktion mit selbigen Enzymen unterzogen (Abb. 4-83).





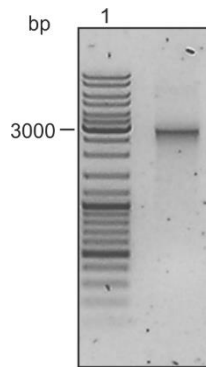
**Abb. 4-83:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW31 (*cdpNPT* + *gpdA<sub>p</sub>* in pQE-60) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Anschließend wurde dieser Vektor um den *trpC* Terminator erweitert. Dazu wurde der Zielvektor mit *BglII* und *HindIII* geöffnet und mit dem *trpC<sub>term</sub>*-Fragment, welches mit den gleichen Enzymen aus pCaW30 entlassen wurde, ligiert. Die Transformation dieses Vektors pCaW32 erfolgte erneut in *E. coli* DH5α. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch eine Restriktionsanalyse mittels *BglII/HindIII* bestätigt (Abb. 4-84).



**Abb. 4-84:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW32 (*cdpNPT* + *gpdA<sub>p</sub>* + *trpC<sub>term</sub>* in pQE-60) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Zur Vervollständigung des Konstruktes wurde nun der Selektionsmarker *pyroA* mit dem vektorspezifischen KS-Primer und CaW\_*pyroA*-rev (Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6) aus pAS2 (Bouhired *et al.*, 2007) amplifiziert. Daraufhin erfolgte die notwendige Entfernung des Template-Konstruktes mittels *DraI*-Verdau und eine abschließende Aufreinigung mittels Gelextraktion (Abb. 4-85).

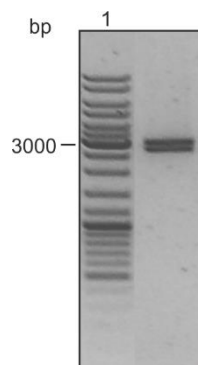
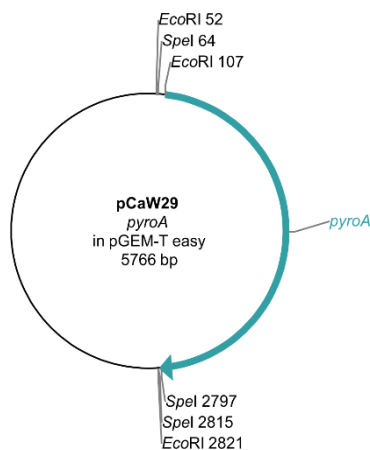


<i>pyroA</i>	94 °C	94 °C	59 °C	68 °C	68 °C	4 °C
	3 min	45 s	1 min	3,5 min	7 min	∞
	1 x	30 x			1 x	

	erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
<i>pyroA</i>	2749	2,8

**Abb. 4-85:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation von *pyroA* aus pAS2. 1. Laufspur: DNA-Größenstandard.

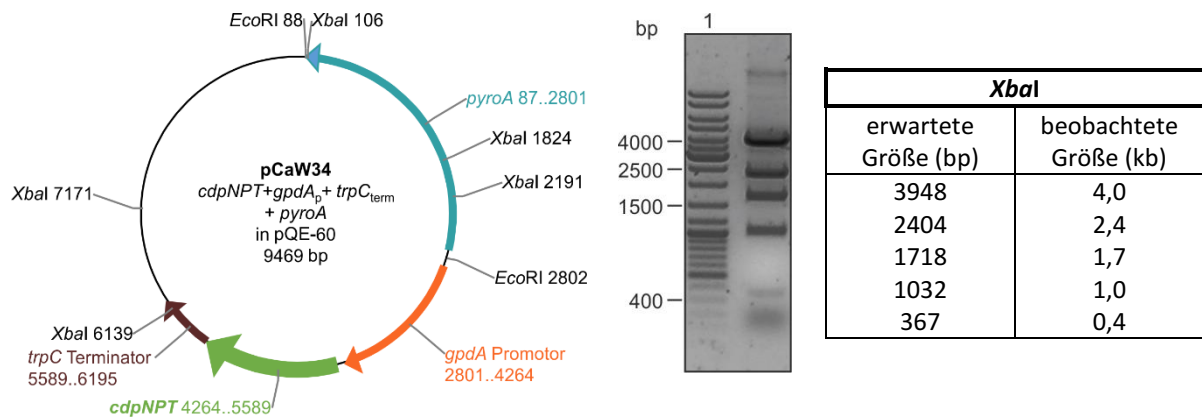
Daraufhin erfolgte die Ligation in pGEM-Teasy, die Transformation in *E. coli* DH5α und nach erfolgreicher Blau-Weiß-Selektion, die Kultivierung potentiell positiver Klone zur Plasmidaufreinigung. Das erhaltene Konstrukt pCaW29 wurde zur Überprüfung mittels *SpeI* analysiert (Abb. 4-86).



<i>SpeI</i>	
erwartete Größe (bp)	beobachtete Größe (kb)
3015	3,0
2733	2,8
18	

**Abb. 4-86:** 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW29 (*pyroA* in pGEM-T easy) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Hieran schloß sich die Überführung des Selektionsmarkers in pCaW32 an. Dabei wurde unter erneuter Öffnung der *EcoRI*-Schnittstelle an Position 88 bp (Abb. 4-83) der gleichermaßen behandelte *pyroA*-Bereich aus pCaW29 inseriert. Nach Überführung in *E. coli* DH5α wurde das Plasmid gewonnen und seine Identität mittels *XbaI* bestätigt (Abb. 4-87).



**Abb. 4-87: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von pCaW34 (*cdpNPT* + *gpdA<sub>p</sub>* + *trpC<sub>term</sub>* + *pyroA* in pQE-60) mit zugehöriger Vektorkarte.** Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Anhand der *XbaI*-Schnittstellen in *pyroA* konnte auch dessen Orientierung festgelegt werden. Der Selektionsmarker liegt demzufolge in entgegengesetzter Richtung zu den anderen Elementen in pCaW34 vor. Diesbezüglich sollte es jedoch keine Vorbehalte gegen eine Verwendung dieses Konstruktes für die vorgesehene Transformation geben. Lediglich die Tatsache der Stopcodon-Mutation zur Erweiterung des Leserahmens für die Integration eines His-tag in den pQE-Vektoren. Aus diesem Grund wurde das Stopcodon durch zielgerichtete Mutagenese (Zheng *et al.*, 2004) zurückmutiert, dazu wurde aus der *Bgl*II-Schnittstelle AGATCT an Position 5588 bp durch überlappende Primer, welche die entsprechende Mutation tragen wieder TGATCT. Daraufhin wurde der Ansatz zur Entfernung des parentalen Template-Plasmides *DpnI* behandelt und für die Transformation von *E. coli* DH5α verwendet. Das neu entstandene Plasmid bekam die Bezeichnung pCaW34stop (Abb. 4-88).

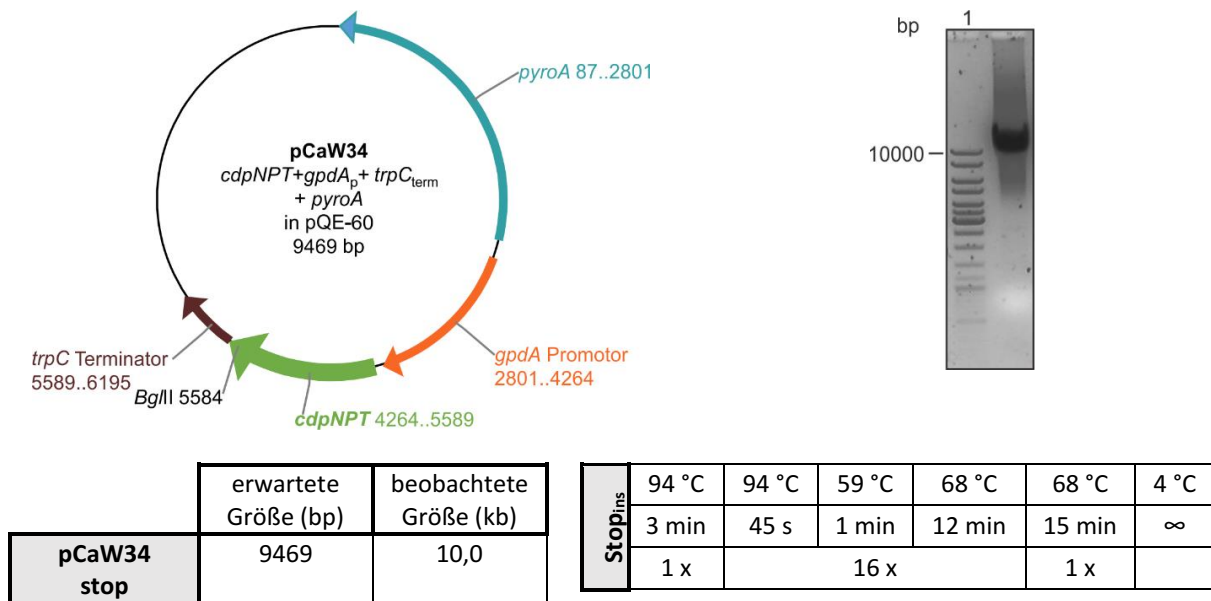


Abb. 4-88: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung der zielgerichteten Mutation von **pCaW34stop** (*cdpNPT* + *gpdA<sub>p</sub>* + *trpC<sub>term</sub>* + *pyroA* in pQE-60) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

Die Überprüfung des Plasmides erfolgte durch einen *Bgl*II-Verdau vergleichend zum unmutierten Plasmid pCaW34, sowie durch eine Sequenzierung des mutierten Bereiches (Abb. 4-89).

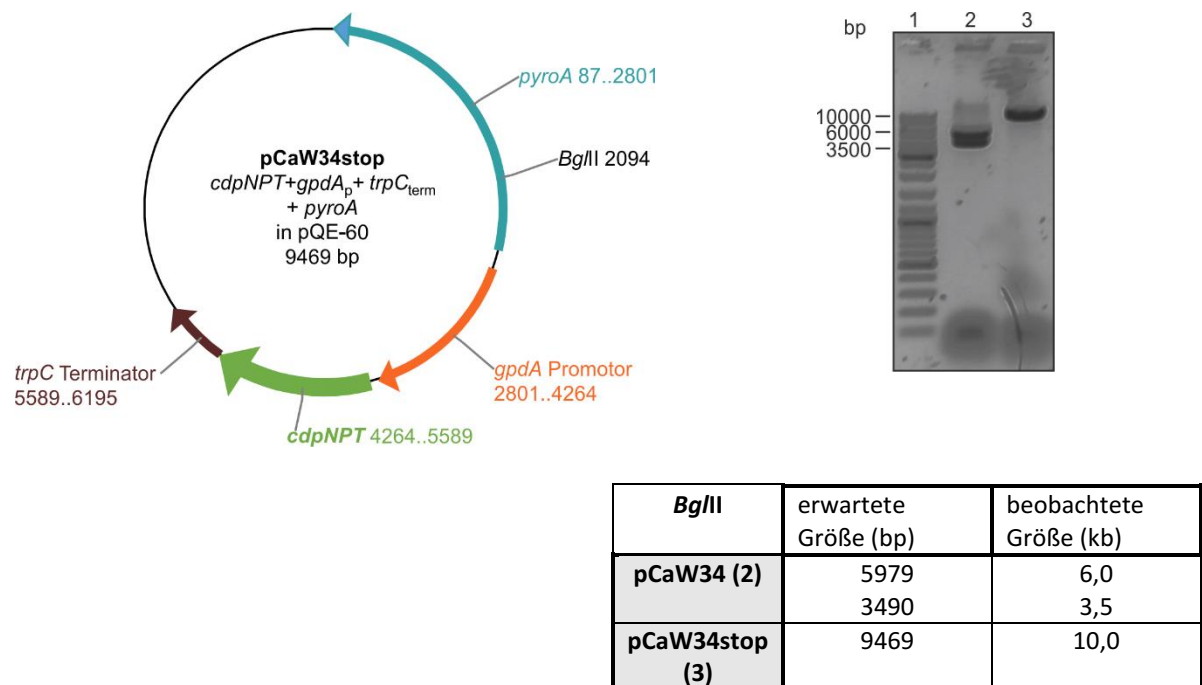
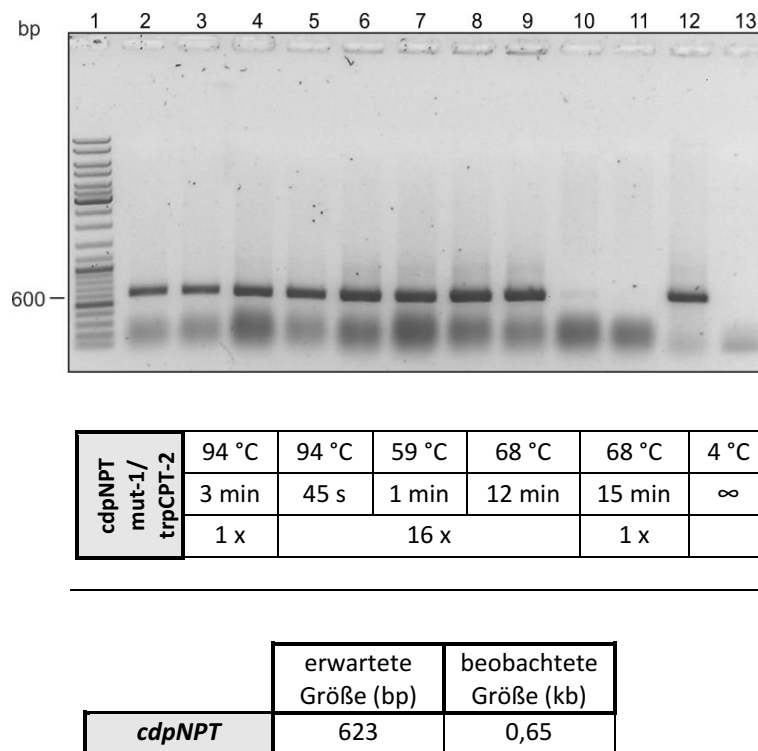


Abb. 4-89: 0,8 %iges Agarosegel zur Überprüfung von **pCaW34stop** (*cdpNPT* + *gpdA<sub>p</sub>* + *trpC<sub>term</sub>* + *pyroA* in pQE-60) mit zugehöriger Vektorkarte. Gekennzeichnet sind die zur Überprüfung benötigten Restriktionsschnittstellen.

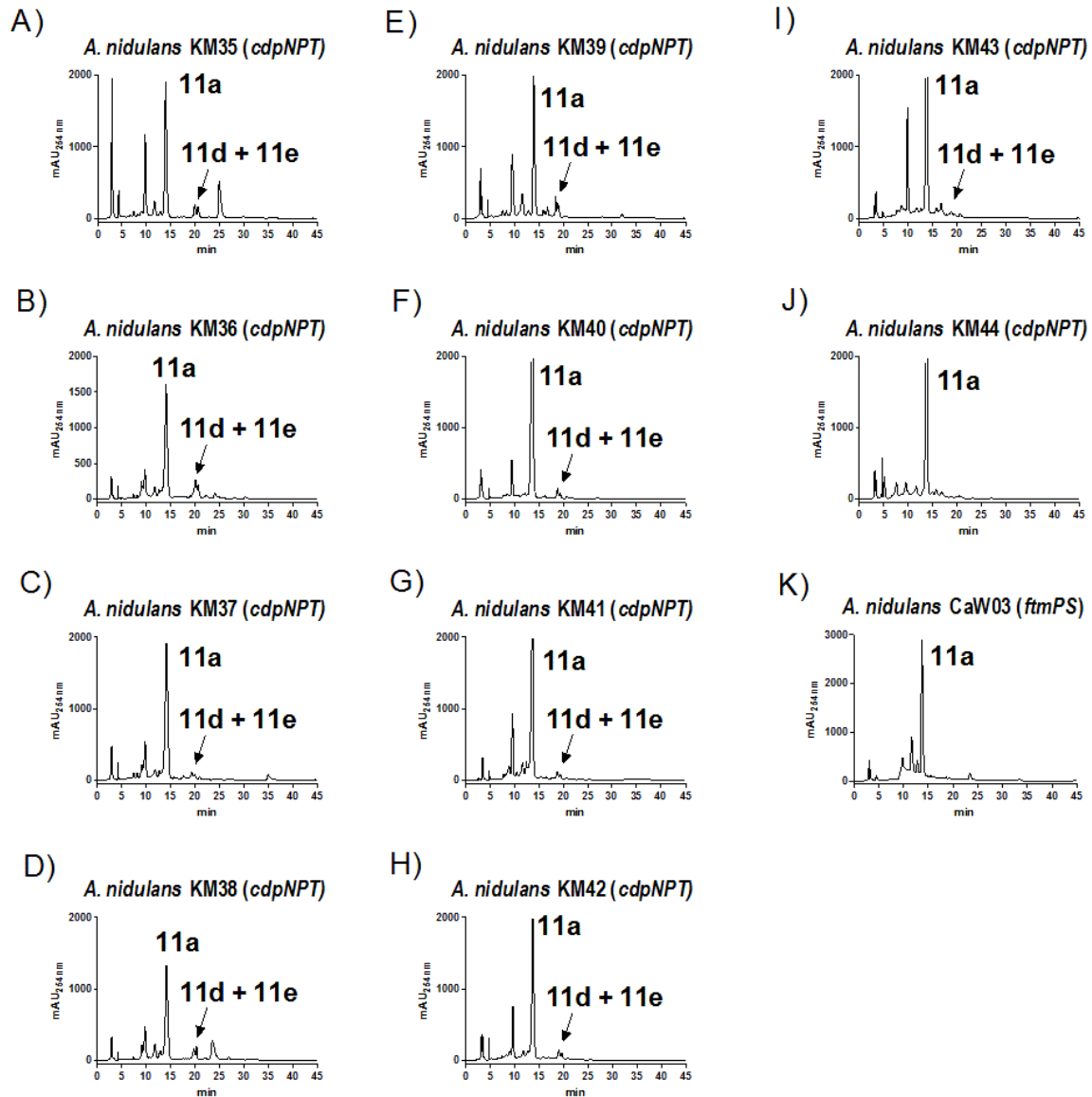
#### 4.2.5.4 Transformation von pCaW34stop in *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*)

Nach erfolgreicher Fertigstellung des Expressionskonstruktes wurde die Transformation von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) angestrebt. Dieser und sämtlichen weiteren Schritte wurden durch Frau Dr. Kathrin Mundt durchgeführt. Die Transformation erfolgte wiederum  $\text{Ca}^{2+}$ -PEG vermittelt und die erhaltenen Transformanten wurden auf Pyridoxin-freien Selektionsmedium dreifach selektiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Integration von pCaW34stop wurde die genomische DNA isoliert und ein PCR-Nachweis erbracht (Primer *cdpNPTmut-1*/*CaW\_trpCPT-2*; Kapitel 3.2.2; Tab. 3-6).



**Abb. 4-90: 1 %iges Agarosegele zur Überprüfung der Kontroll-PCR.** Laufspur 1: DNA-Größenstandard; Laufspur 2 - 11: *A. nidulans* KM35 - 44; Laufspur 12: Positivkontrolle pCaW34stop; Laufspur 13: Negativkontrolle *A. nidulans* CaW03.

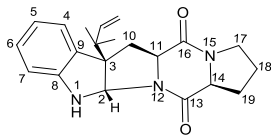
Nach erfolgreicher Bestätigung der Transformanten wurden diese für 5 Tage unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschließend die Sekundärmetabolite durch Frau Dr. Kathrin Mundt extrahiert (Kapitel 3.8.1) und mittels HPLC analysiert (Abb. 4-91).



**Abb. 4-91:** HPLC-Chromatogramme der *cdpNPT* Transformanten von *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*). A) - J) entsprechen fortlaufend den Transformanten, sowie K) dem untransformierten Stamm *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*). **11a** entspricht *cyclo*-L-Trp-L-Pro, **11d** und **11e** den Produkten.

Es konnte in allen durch die PCR positiv bestätigten Transformanten auch eine Produktbildung nachgewiesen werden. Von beiden beobachteten Produkten konnte jedoch nur die Struktur von Produkt **11e** abschließend aufgeklärt werden.

**Tab. 4-18:  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von *cyclo*-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro und des Isolats (**11e**).** Das Spektrum wurde an einem JEOL ECA-500 Spektrometer aufgenommen, Chemische Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in ppm und Kopplungskonstanten in Hz angegeben,

		
	<b><i>cyclo</i>-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro</b> (Yu <i>et al.</i> , 2013) $\delta_{\text{H}}$ ; multi,; J in Hz	<b>Isolat (<b>11e</b>)</b> $\delta_{\text{H}}$ ; multi,; J in Hz
<b>Proton</b>	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>
<b>2</b>	5,46; s	5,45; s
<b>4</b>	7,16; d; 7,6	7,15; d; 7,5
<b>5</b>	6,77; t; 7,6	6,75; td; 7,5; 1,0
<b>6</b>	7,11; t; 7,6	7,09; td; 7,6; 1,2
<b>7</b>	6,59; d; 7,6	6,58; dd; 7,8; 1,0
<b>10a</b>	2,49; dd; 12,9; 6,7	2,48; dd; 12,9; 10,8
<b>10b</b>	2,54; dd; 12,9; 6,7	2,53; dd; 12,9; 6,7
<b>11</b>	3,99; dd; 10,8; 6,7	3,97; ddd; 10,8; 6,7; 1,6
<b>14</b>	4,05*	4,04; ddd; 9,4; 7,3; 1,9
<b>17a</b>	3,56; m	3,55; m
<b>17b</b>	3,50; m	3,50; m
<b>18</b>	2,04; m	2,04; m
	1,89; m	1,89; m
<b>19</b>	2,32; m	2,30; m
<b>1'</b>	2,12; m	2,11; m
<b>2'</b>	5,12; d; 10,8	5,12; dd; 10,8; 1,1
	5,07; d; 17,4	5,08; dd; 17,4; 1,2
<b>3'</b>	5,98; dd; 17,4; 10,8	5,98; dd; 17,4; 10,8
<b>4'</b>	1,11; s	1,10; s
<b>5'</b>	1,01; s	0,99; s

Da die Zuordnung mit dem Vergleichsspektrum übereinstimmte konnte durch Frau Dr. Mundt das Isolat eindeutig als *cyclo*-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro identifiziert werden (Anhang Kapitel 7.7: Abb. 7-47). Auch die massenspektrometrische Analyse zeigte die vollkommene Übereinstimmung der theoretischen mit der gemessenen Masse von  $m/z = 351,19$  (Anhang Kapitel 7.7: Abb. 7-48). Für die einzelnen Transformanten wurden auch die Ausbeuten an Brevianamid F und *cyclo*-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro bestimmt, die im Mittel für **11a** bei 41,7 mg  $\text{l}^{-1}$ , **11d** bei 2,0 mg  $\text{l}^{-1}$  und **11e** bei 1,3 mg  $\text{l}^{-1}$  lagen (Tab. 4-19).

Tab. 4-19: Produktausbeuten der einzelnen Transformanten

Transformant <i>A. nidulans</i>	Produkt [mg l <sup>-1</sup> ]		
	11a	11d	11e
<i>ftmPS + cdpNPT</i>			
KM35	38,8 ± 0,05	2,3 ± 0,09	1,8 ± 0,07
KM36	39,7 ± 0,05	3,5 ± 0,06	2,8 ± 0,06
KM37	40,7 ± 0,06	1,5 ± 0,03	0,9 ± 0,06
KM38	39,6 ± 0,07	3,0 ± 0,03	0,9 ± 0,08
KM39	47,2 ± 0,05	1,5 ± 0,09	0,8 ± 0,09
KM40	43,4 ± 0,06	1,0 ± 0,07	0,4 ± 0,05
KM41	39,0 ± 0,14	1,8 ± 0,09	1,2 ± 0,03
KM42	45,6 ± 0,10	2,6 ± 0,08	1,1 ± 0,05
KM43	38,9 ± 0,06	1,9 ± 0,06	1,9 ± 0,05
KM44	44,0 ± 0,05	1,1 ± 0,08	1,0 ± 0,06

Auch die Transformation mit den Konstrukten der anderen Prenyltransferasen erbrachte die Produktion der gewünschten Sekundärmetabolite, demnach ist diese Technik hervorragend geeignet auf diesem Wege gezielt präferierte Sekundärmetabolite durch *in vivo* Biosynthese zu erhalten.



## 5 Diskussion

### 5.1 Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus Ascomyceten

#### 5.1.1 Die Prenyltransferase CdpC7PT

In der vorgestellten Arbeit wurde das putative Prenyltransferasegen *ATEG\_04218* aus dem Ascomyceten *A. terreus* DSM 1958 amplifiziert und in einen für die heterologe Expression in *E. coli* geeigneten Expressionsvektor pQE-60 überführt. Nach erfolgreicher Kultivierung und Expression in *E. coli* konnten etwa 2,4 mg lösliches Protein EAU36020-His<sub>6</sub> pro Liter LB-Kultur aufgereinigt werden. Im genetischen Umfeld von 50 kb befinden sich lediglich weitere Modifikationsenzyme, wie eine Aminooxidase oder auch ein Cytochrom P450-Enzym, jedoch keine Grundstruktur-bildenden Enzyme, wie NRPS oder PKS, die Hinweise auf das natürliche Substrat geben könnten. Dennoch aufgrund der Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene von CdpC7PT zu anderen bereits bekannten zyklische Dipeptid-akzeptierenden Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie, wie CTrpPT (Zou *et al.*, 2010) von 29 %, BrePT mit 32 % (Yin *et al.*, 2013a) oder CdpC2PT (Mundt & Li 2013) von 34 %, wurden zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität sämtliche zur Verfügung stehenden Dipeptide in Verbindung mit diesem Enzym und DMAPP als Donor für die Prenylierungseinheit inkubiert. Zu diesen zählten sowohl zyklische Dipeptide mit Tryptophan- und/oder Tyrosinrest (**1a** - **16a**; **18a** - **21a**), aber auch die Aminosäuren Tryptophan (**17a**) und Tyrosin (**22a**) als solches wurden analysiert. Im überwiegenden Teil der Ansätze konnten jeweils 1 bis 3 Produkte verzeichnet werden. Insbesondere im Fall von *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**) konnten Analogien zu CTrpPT aus *A. oryzae* festgestellt werden (Zou *et al.*, 2010). Da diese Prenyltransferase für die Produktion von C7- und N1-prenylierten Derivaten im Zusammenhang mit diesem Substrat bekannt ist, wurden vergleichende Enzymassays mit den erwähnten Substraten unter identischen Bedingungen durchgeführt und analysiert. Dabei konnte im Fall von beiderseitig akzeptierten Substraten für das Hauptprodukt übereinstimmende Retentionszeiten beobachtet werden, was die Produktion ein und desselben Derivates vermuten lässt. Andererseits konnten auch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Substratpräferenz beider Enzyme beobachtet werden. Beispielsweise zeigte CdpC7PT die höchste Akzeptanz für (S)-Benzodiazepindion (**1a**) mit einem Umsatz von 45,6 %, während bei CTrpPT lediglich 10,9 % erzielt werden konnten.

Ausserdem zeigt CdpC7PT hinsichtlich der tryptophanhaltigen Dipeptide zwar geringere Umsatzraten, aber auch eine breitere Substratspezifität als CTrpPT, wie es unter anderem für *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**11a**) oder *cyclo*-L-Trp-Gly (**15a**) festgestellt werden konnte (Abschnitt 4.1.2.4, Abb. 4-5). Stattdessen liegt die Substratpräferenz von CTrpPT hauptsächlich bei *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**) mit 89 %, gefolgt von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**); *cyclo*-L-Trp-L-Leu (**6a**) und *cyclo*-L-Trp-L-Phe (**5a**) mit 53, 34 und 11 %. Eine Vielzahl zyklischer Dipeptide, unter anderem *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**) und andere tyrosinhaltige Dipeptide wiederum, wurden durch CTrpPT nicht akzeptiert (Tab. 4-2). Diese Ergebnisse für CdpC7PT spiegeln sich auch in den erhaltenen kinetischen Parametern wider. Zu (S)-Benzodiazepindion (**1a**) zeigte CdpC7PT die höchste Affinität mit einem  $K_M$ -Wert von 204,1  $\mu\text{M}$ , sowie einer Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) von 0,125  $\text{s}^{-1}$ . Für die anderen aromatischen Substrate lagen die  $K_M$ -Werte für im Bereich von 239,3  $\mu\text{M}$  bis 746,9  $\mu\text{M}$  und für die Wechselzahlen zwischen 0,009 und 0,049  $\text{s}^{-1}$ . Im Fall von *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**) konnte ein deutlich höherer  $K_M$ -Wert von 1411  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Durch die Strukturaufklärung von insgesamt elf Produkten aus sieben verschiedenen Substraten konnte für sechs der Hauptprodukte eine reguläre C7-Prenylierung bestätigt werden. Demzufolge erfolgte auch die Kategorisierung von EAU36020 als zyklische Dipeptid akzeptierende C7-Prenyltransferase. Im Fall von *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**), *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) und *cyclo*-L-Trp-L-Ala (**6a**) konnten noch weitere Nebenprodukte identifiziert werden. Bei *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**) konnte in Übereinstimmung mit CTrpPT eine zusätzliche N1-Prenylierung beobachtet werden, während bei *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) und *cyclo*-L-Trp-L-Ala (**7a**) ein weiteres C3-prenyliertes Produkt bestätigt werden konnte. Eine Besonderheit von CdpC7PT ist die Akzeptanz von *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**), da sie zum jetzigen Zeitpunkt die erste Prenyltransferase der DMATS-Superfamilie darstellt, welche in der Lage ist tyrosinhaltige zyklische Dipeptide an der phenolischen Hydroxygruppe zu prenylieren. Auch für *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) konnte, als ein weiteres Nebenprodukt, eine O-Prenylierung eindeutig belegt werden. Für Derivate von Tryptophan und Tyrosin sind hingegen bereits drei Enzyme charakterisiert SirD, 7-DMATS und TyrPT, die sowohl bei Tryptophan eine C7- und für Tyrosin eine O-Prenylierung vollführen können (Fan *et al.*, 2014; Fan & Li 2014; Kremer & Li 2010; Rudolf & Poulter 2013; Zou *et al.*, 2011). Dies zeigt einen denkbaren evolutionären Zusammenhang zwischen C7- und O-Prenyltransferasen auf, welcher möglicherweise durch die O-Prenylierung des Tyrosinrestes von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**) und *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr (**18a**) auch auf tryptophanhaltige, zyklische Dipeptid-akzeptierende C7-Prenyltransferasen übertragbar ist.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim präferierten Substrat von CdpC7PT um (*S*)-Benzodiazepindion (**1a**), welches interessanterweise auch das bevorzugte Substrat der reversen C2-Prenyltransferase CdpC2PT aus *N. fischeri* darstellt (Mundt & Li 2013). Für diese C7- oder C2-prenylierten Verbindungen konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht die natürliche Entsprechung oder mögliche Derivate isoliert und bestätigt werden. Das zugehörige Enantiomer hingegen, (*R*)-Benzodiazepindion (**2a**) ist nachweislich in der Biosynthese von Acetylaszonalenin involviert (Ames & Walsh 2010; Yin *et al.*, 2009b) und wird hierbei durch die Prenyltransferase AnaPT, in *A. terreus* kodiert durch *ATEG\_10306*, modifiziert (Yin *et al.*, 2009b). Durchgeführte HPLC-MS Analysen lassen auf die Präsenz von Aszonalenin in den Überständen der Pilzkulturen von *A. terreus* schließen (Abb. 4-14; Anhang Abb. 7-35 und Abb. 7-36). Ein Nachweis für prenyliertes (*S*)-Benzodiazepindion, *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**3a**), *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**4a**), *cyclo*-L-Trp-L-Phe (**5a**) oder *cyclo*-L-Trp-L-Leu (**6a**) konnte jedoch leider nicht erbracht werden. Daraus erwächst die Schlussfolgerung, dass unter den gewählten Kulturbedingungen keine Expression von *cdpC7PT* stattfindet, was zudem auch die bereits erwähnte fehlgeschlagene Amplifikation des Genes aus cDNA erklären würde.

Nur einige wenige natürliche C7-prenylierte Derivate von *cyclo*-L-Trp-L-Ala (**7a**) sind bisher bekannt, wie Astechrom, Terezin D und die Echinuline (Arai *et al.*, 1981; Birch *et al.*, 1961; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1995). Interessanterweise wurde das Biosynthesecuster von Astechrom bereits in *A. fumigatus*, *N. fischeri* und *A. terreus* aufgeklärt (Kremer *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2013b), wobei 7-DMATS, in *A. terreus* durch das Ortholog *ATEG\_08428* kodiert, eine entscheidende Rolle spielt. Bei dieser Biosynthese entsteht zudem das angesprochene Terezin D als ein Nebenprodukt (Yin *et al.*, 2013b). Weiterhin wird auch für die Biosynthese von Echinulinen zwingend eine NRPS benötigt, die aber im unmittelbaren genetischen Umfeld (50 kb) leider nicht nachweisbar ist. Alle diese Sachverhalte sprechen somit gegen eine mögliche Beteiligung von CdpC7PT an den Biosynthesen dieser Sekundärmetabolite und zusätzlich die Tatsache der geringen Akzeptanz von CdpC7PT gegenüber *cyclo*-L-Trp-L-Ala (**7a**) mit einem  $K_M$  von 744,7  $\mu\text{M}$  und einer katalytischen Konstanten von 0,009  $\text{s}^{-1}$ . Zum jetzigen Zeitpunkt unter Ermangelung weiterer bekannter C7-prenylierter Substanzen in der Natur bleibt die eigentliche Rolle von CdpC7PT in *A. terreus* vorerst ungeklärt.

### 5.1.2 Die Prenyltransferase EAU34068

Das rekombinante Protein EAU34068-His<sub>6</sub> konnte mit einer Ausbeute von 29 mg pro Liter Kultur aus *E. coli* M15-Zellen gewonnen werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene zu AnaPT (Yin *et al.*, 2009b) mit 42 %, cTrpPT (Zou *et al.*, 2010) mit 29 % und FgaPT2 (Unsöld & Li 2005) mit ebenfalls 29 % wurde die enzymatische Aktivität, sowohl mit zyklischen Dipeptiden, als auch Indolderivaten überprüft. Weiterführend wurde die Suche nach geeigneten Substraten auf weitere Substanzgruppen ausgedehnt (Abschnitt 4.1.3.5, Tab. 4-7). Insbesondere bei den Flavonoiden, Hydroxynaphthalinen und Xanthonen konnte im Zusammenhang mit dem Prenyldonor GPP die Akzeptanz für einige Vertreter beobachtet werden. Zu diesen zählten die Flavanone Eriodictyol (**23a**) mit 32,1 % und Naringenin (**24a**) mit 31,4 %. Bei den Hydroxynaphthalinen sind es 1-Naphthol (**25a**) mit 7,3 % und 1,7-Dihydroxynaphthalin (**26a**) mit 13,2 %. Unter den Xanthonen zeigt 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**) mit 9 % den höchsten Umsatz. Flavonoide dienen einigen Prenyltransferasen der UbiA-Superfamilie als natürliche Substrate. Einzuordnen sind hier die drei membrangebundenen Vertreter SfN8DT, SfG6DT und SfILD1 aus *Sophora flavescens* (Sasaki *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2011), die zudem mit einer hohen Substratspezifität aufwarten. Aber auch Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe, wie NovQ und NphB sind in der Lage Flavonoide umzusetzen (Kumano *et al.*, 2008; Ozaki *et al.*, 2009), sowie 7-DMATS, ein Mitglied der DMATS-Superfamilie, welches nachweislich Flavonoide überwiegend an Position C6 des Ringes A am Flavanongrundgerüst prenyliert (Yu & Li 2011). Bei Hydroxynaphthalinen handelt es sich um die natürlichen Substrate der Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe (Kumano *et al.*, 2008; Kuzuyama *et al.*, 2005). Ptf<sub>AT</sub>, ein weiteres Enzym dieser Gruppe aus *A. terreus*, ist ebenfalls in der Lage 2,7-Dihydroxynaphthalin umzusetzen (Haug-Schifferdecker *et al.*, 2010). Hydroxynaphthalin-akzeptierende Vertreter der DMATS-Superfamilie sind unter anderem AnaPT, CdpNPT, CdpC3PT, 7-DMATS und BAE61387 (Pockrandt *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2011). Dabei finden neben DMAPP (Yu *et al.*, 2011) auch GPP und FPP als Prenyldonatoren ihre Anwendung (Pockrandt *et al.*, 2014). Neben der Akzeptanz gleicher Substrate, wie Flavonoide und Hydroxynaphthalene zeigen FgaPT2, FtmPT1, CdpNPT und AnaPT auch strukturelle Ähnlichkeiten zu Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe (Jost *et al.*, 2010; Metzger *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013). Demnach verfügen sie ebenfalls über ein „PT-barrel“, welches zur Annahme einer gemeinsamen Abstammung führt (Bonitz *et al.*, 2011).

Hinsichtlich der Akzeptanz von Xanthonen sind bereits zwei Mitglieder der DMATS-Superfamilie biochemisch charakterisiert worden, wobei XptB an der Biosynthese von *epi*-Shamixanthon beteiligt ist (Pockrandt *et al.*, 2012; Sanchez *et al.*, 2011) und AstPT Xanthone als unnatürliche Substrate (Tarcz *et al.*, 2014b) verwenden kann. Zusammenfassend kann demnach die außerordentliche breite Substratspezifität, insbesondere der DMATS-Superfamilie festgehalten werden, welches sie unter anderem zu einem wertvollen Werkzeug für die chemoenzymatische Synthese diverser prenylierter Substanzen mit enormer pharmazeutischer Bedeutung oder entsprechendem Potential werden lässt (Steffan *et al.*, 2009a; Wollinsky *et al.*, 2012b; Yu & Li 2012). Einige Vertreter, unter anderem EAU34068 sind somit in der Lage unnatürliche aromatische Substrate, wie Flavonoide und auch Hydroxynaphthaline, die nicht in Pilzen vorkommen, umzusetzen. Dennoch weisen sie eine strikte Regioselektivität auf (Yu & Li 2012). Im Fall von EAU34068 erfolgen die Prenylierung der Hydroxynaphthaline (**25a**, **26a**) regiospezifisch an C4 und bei den Flavanonen (**23a**, **24a**) an Position C5' bzw. C3' des Ringes B.

Bezüglich der kinetischen Parameter zeigte EAU34068-His<sub>6</sub> bei den getesteten Substraten  $K_M$ -Werte zwischen 1,1 mM (**26a**) und 1,9 mM (**23a**). Diese Werte sind, eine Vielzahl anderer Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie betreffend, vergleichsweise hoch. (Yu & Li 2012). Jedoch konnte im Fall von Eridictyol (**23a**) trotz des höchsten  $K_M$ -Wertes auch eine deutlich höhere Wechselzahl von 0,55 s<sup>-1</sup> beobachtet werden. Diese Besonderheit konnte bereits auch bei anderen Prenyltransferasen, wie XptB oder AuaA (Pockrandt *et al.*, 2012; Stec *et al.*, 2011) aufgezeigt werden. Demzufolge ist die katalytische Effizienz für Eridictyol (**23a**) dennoch am größten, gefolgt von den Hydroxynaphthalinen (**25a**, **26a**) und abschließend mit 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**27a**), bei dem die relative katalytische Effizienz lediglich bei 30,6 % vergleichend zu Eridictyol (**23a**) liegt. Diese Ergebnisse und weitere Resultate der Kooperationspartner zu diesem Projekt, lassen die Vermutung aufkommen, dass es sich nicht um die natürlichen Substrate handelt. Derzeit konnte offenbar die Prenylierung von mehr als 35 aromatischen Substanzen, auch unter Verwendung anderer Prenyldonatoren, wie GPP, FPP und GGPP für die Prenyltransferase EAU34068 beobachtet werden.

### 5.1.3 Die putativen Prenyltransferasen EAU36097, EAU33872 und EAU38487

Die drei putativen Prenyltransferasen befinden sich derzeit noch im Klonierungsstadium. *ATEG\_02823* (EAU36097) und *ATEG\_06111* (EAU33872) befinden sich bereits im vorgesehenen pQE-Expressionskonstrukt und erste Expressionsstudien wurden durchgeführt, jedoch konnte noch kein überproduziertes Protein erhalten werden. Im Fall von *ATEG\_02823* konnte zu einem späteren Zeitpunkt leider ein Sachverhalt festgestellt werden, welcher zum Abbruch der Proteinbiosynthese durch die Verschiebung des Leserahmens führte. Dies ist dem Umstand zu schulden, dass aufgrund einer weiteren *SphI*-Schnittstelle im Konstrukt pCaW5 (Abschnitt 4.1.4.3, Abb. 4-24) ein zu großes Fragment für die Umklonierung in pQE-70 erhalten wurde. Bei *ATEG\_06111* bedarf es weiterer Optimierungen hinsichtlich der Expression. Dazu gehören unter anderem die Veränderung der Kultivierungstemperatur oder der Induktorkonzentration, sowie ein Wechsel des Expressionstammes. Möglicherweise bestehen noch andere Ursachen für das nicht nachweisbare Protein, beispielsweise besitzt EAU33872 zahlreiche Arginin-, Leucin- und Phenylalaninreste in seiner Aminosäuresequenz, welche eine entscheidende Funktion hinsichtlich der Proteinstabilität besitzen können. Befinden sich eine Vielzahl dieser Aminosäuren am N-Terminus eines Proteins kann dies zur deutlichen Abnahme der Halbwertszeit durch Protease-Degradation führen (Tobias *et al.*, 1991). Der proteolytische Abbau von rekombinanten Proteinen kann auch durch die Reduzierung der Kultivierungstemperatur erreicht werden, auch wenn mit dieser Maßnahme eine geringere Ausbeute einhergeht (Chaudhuri 2013). Andere Ursachen könnten in der möglichen Toxizität des Proteins begründet sein, welche sich auf verschiedene Arten äußern kann. Sollte ein Promotor vor der Induktion bereits eine basale Expression erlauben, kann dies zur Beeinträchtigung der Zellkondition, sowie zur Plasmidinstabilität führen. Dies kann unter Verwendung anderer Promotoren oder vermehrter Repressorpräsenz unterbunden werden (Rosano & Ceccarelli 2014; Saida *et al.*, 2006). Auch eine Optimierung der verwendeten Codons hinsichtlich des Expressionswirtes, in diesem Fall *E. coli*, wäre denkbar, da dieses mitunter andere Codons präferiert und entsprechende t-RNA Spezies verwendet, als *Aspergillus* (Fakruddin *et al.*, 2013). Allerdings wurde dieser Umstand noch bei keiner bisher charakterisierten Prenyltransferase in unserem Arbeitskreis beobachtet. Zur Umgehung dieser Gegebenheit wäre auch die Expression in einem eukaryotischen Expressionssystem, beispielsweise in *S. cerevisiae* denkbar.

## 5.2 Untersuchungen zu putativen Nichtribosomalen Peptidsynthetasen und NRPS-ähnlichen Enzymen aus Ascomyceten

### 5.2.1 Untersuchungen zu den Nichtribosomalen Peptidsynthetasen EAA61517 und EAW25548, sowie dem NRPS-ähnlichen Enzym EAU36364

Das Projekt wurde für die Expression dieser Enzyme in *A. nidulans* TN02A7 angelegt. Die Hauptaufgaben bestanden in der Erstellung eines geeigneten Transformations- bzw. Expressionskonstruktes, die Einbringung in *A. nidulans* mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -PEG-vermittelter Transformation von Protoplasten und die anschließende Identifizierung und Aufklärung zusätzlich erhaltener Sekundärmetabolite in den Extrakten der Transformanten. Beide putativen NRPS zeigen den gleichen modularen Aufbau und eine Sequenzidentität von 52 % auf Aminosäureebene zueinander auf. Das Vorhandensein zweier Module mit jeweiliger Adenylierungs (A)-, Thiolierungs (T)-, sowie Kondensationsdomäne (C) lässt auf die Inkorporation von zwei Aminosäuren schließen, demnach für eine Biosynthese eines Dipeptides.

Für *NFIA\_043670* wurde bereits durch die Charakterisierung der im Umfeld befindlichen Prenyltransferase CdpC2PT eine mögliche Beteiligung an der Biosynthese der Fellutanine postuliert, zudem ist hier auch eine benötigte Aminooxidase vorzufinden, welche sich für den letzten Schritt des Biosyntheseweges von Fellutanin C zu Fellutanin D verantwortlich zeigen könnte (Mundt & Li 2013). Die erste Adenylierungsdomäne beider NRPS besitzt zudem einen ähnlichen NRPS-Code (Röttig *et al.*, 2011), während die zweiten Adenylierungsdomänen deutlichere Unterschiede zueinander aufweisen (Abb. 5-1). Durch den Vergleich mit bereits charakterisierten NRPS sollen somit Aussagen über die Spezifität der Adenylierungsdomänen ermöglicht werden (Kalb *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2013). Demnach ist die erste Adenylierungsdomäne beider NRPS für die Aktivierung von Anthranilat bestimmt, während für die zweite Adenylierungsdomäne noch keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden konnten.

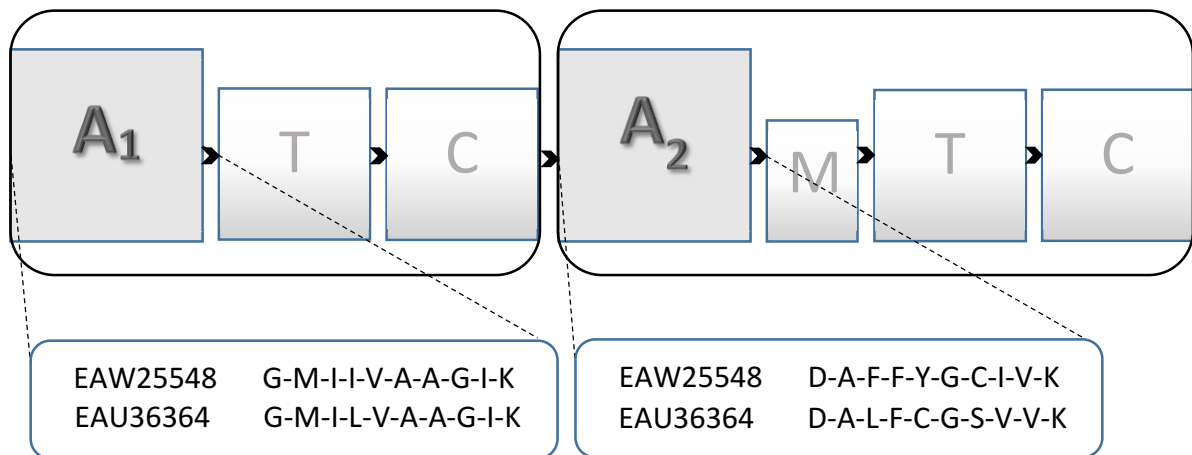


Abb. 5-1 Modul- und Domänenstruktur der NRPS EAW25548 und EAU36364

Während der Vorhersage der Domänenstruktur mit Hilfe der Aspergillus Comparative Database des Broad Institutes und der Annotierung konservierter Domänenbereich durch NCBI konnte eine Diskrepanz beobachtet werden. Die Auswertung der prognostizierten Domänenstruktur durch NCBI ergab eine zusätzliche putative Methylierungsdomäne im zweiten Modul beider NRPS. Das Vorkommen diverser Modifikationsdomänen, wie Epimerisationsdomänen, *N*-Acetylierungs- oder auch *N*-Methylierungsdomänen ist ebenfalls belegt und zeigen, dass diese Domänen zur strukturellen Diversität der generierten Produkte beitragen (Mootz *et al.*, 2002; Osbourn *et al.*, 2014; Rausch *et al.*, 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Vorhersagen, besteht aber dennoch die Möglichkeit, dass diese Methylierungsdomäne nicht korrekt annotiert wurde. Bezüglich des vermeintlichen NRPS-ähnlichen Enzyms EAU36364 liegt kein modularer Aufbau vor. Es ist auch nicht durch das Vorhandensein einer typischen Kondensationsdomäne (C) gekennzeichnet, sondern verfügt lediglich über eine Adenylierungs- und Thiolierungsdomäne. Daher könnte die Freisetzung des Endproduktes von einer zusätzlichen Thioesterase abhängig sein, ähnlich wie dies bei einigen fehlbeladenen NRPS der Fall ist, wo externe Thioesterasen zur Regeneration der prostetischen Gruppe, des 4-Phosphopanthein der Thiolierungsdomäne benötigt werden (Koglin *et al.*, 2008; Schwarzer *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 2004). Weiterführende Sequenzanalysen zeigten auch die Möglichkeit eines weiteren erdenklichen Leserahmens, dieser würde laut Domänenstrukturanalyse eine putative Hydrolase-Domäne beinhalten, welche bei der Freisetzung eines Produktes von EAU36364 eine Rolle spielen könnte. Aufgrund des bereits



implementierten Terminatorbereiches von 538 bp umfassen die erstellten Konstrukte bereits auch diesen erweiterten Sequenzbereich von *ATEG\_03090*.

Für die Expression in *A. nidulans* wurden die entsprechenden Gene im 5'- und 3'-Bereich um zusätzliche Sequenzabschnitte erweitert, in der Annahme damit den geeigneten Promotor und Terminator zu erfassen. Diese ausgedehnten Genbereiche wurden daraufhin in einen geeigneten Expressions- und Transformationsvektor (pJW24) überführt. Dieser verfügt über den Selektionsmarker *pyrG* (Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase), welcher zur Komplementation des entsprechenden Genes im Uridin/Uracil-auxotrophen Stamm *A. nidulans* TN02A7 benötigt wird. Anschließend erfolgte die  $\text{Ca}^{2+}$ -PEG-vermittelte Transformation (Ballance *et al.*, 1983; Bradshaw 2006). Die erhaltenen Transformanten wurden mehrfach auf geeigneten Medien selektiert und in Flüssigkultur zur Untersuchung der Sekundärmetabolite kultiviert. Mittels PCR erfolgte der Nachweis der Integration ins Genom. Im Fall von AN9226 (EAA61517) bedurfte es einer komplexeren Nachweisstrategie, aufgrund einer bereits vorhandenen Genkopie in *A. nidulans* TN02A7 wurde als Bestätigung ein Amplifikat eines übergreifenden Bereichs von AN9226 und dem Selektionsmarker *pyrG* verwendet. Für das Gen *ATEG\_03090* (EAU36364) konnten bisher leider keine positiven Transformanten bestätigt werden. Durch den Vergleich der Sekundärmetabolitproduktion der Transformanten mit dem untransformierten Stamm *A. nidulans* TN02A7 mittels HPLC konnte für EAA61517 und EAW25548 ein dominantes Produkt mit einer Retentionszeit von 35,5 min bzw. 31 min, je nach verwendeter HPLC-Methode beobachtet werden. Zur Aufklärung der Struktur erfolgte die Isolierung über HPLC und die entsprechende Analyse mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Hierbei konnte aber kein Sekundärmetabolit mit NRPS-Ursprung identifiziert werden, sondern das Polyketid Sterigmatocystin (**28a**), welches auf die Biosynthese durch eine Polyketidsynthase (PKS) zurückzuführen ist. Trotz mehrfacher Unternehmungen konnten keine weiteren Produkte identifiziert werden, die sich vom Sekundärmetabolitspektrum des untransformierten Stammes *A. nidulans* TN02A7 deutlich unterscheiden. Auch bei ähnlich gelagerten Arbeiten konnte ein solcher Umstand ebenfalls nachgewiesen werden. Durch die Erstellung einer  $\Delta fgaP450$ -Deletionsmutante von *P. commune* NRRL 2033 produzierte die Mutante unerwarteter Weise Meleagrin (Steffan 2009). Eine Ursache für fehlende zusätzliche Sekundärmetabolite besteht in der Möglichkeit der Abhängigkeit von AN9226 und *NFIA\_043670* und des gesamten zugehörigen Clusters von der Regulation durch übergeordnete oder Cluster-spezifische Regulatoren, die durch eine

ektopische Integration unter Umständen nicht gewährleistet werden kann. Zu den identifizierten, übergeordneten Regulatoren gehören unter anderem LaeA oder die Transkriptionsfaktoren StuA (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009) oder bZIP (Yin *et al.*, 2012). Die Überexpression dieser Regulatoren erlaubt dabei die Untersuchung sonst kryptischer Sekundärmetabolitcluster. Bei LaeA handelt es sich um ein zellkernlokalisiertes Protein mit putativer Histon-Methyltransferasefunktion, welches sowohl für die positive, als auch negative Regulation von Sekundärmetaboliten verantwortlich ist (Bok & Keller 2004; Keller *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2012). Cluster-spezifische Regulatoren, wie AflR können ebenfalls eine Rolle spielen. AflR ist beispielsweise an der Biosynthese von Asperthecin und Sterigmatocystin (**28a**) in *A. nidulans* beteiligt (Lim *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012) und wird dabei auch durch den übergeordneten Regulator LaeA (Bok & Keller 2004) beeinflusst. Da die Produktion von Sterigmatocystin (**28a**) eher hinderlich ist für die Identifizierung neuer Sekundärmetabolite wäre auch eine zukünftige Verwendung entsprechender  $\Delta laeA$  oder  $\Delta aflR$  Mutanten denkbar.

Da bisher nur eine vermehrte Sterigmatocystin-Produktion der Transformanten beobachtet werden konnte, wurden insbesondere für das NRPS-Gen AN9226 verschiedenste Strategien zur Expressionsoptimierung entwickelt. Zum einen wurde das Transformationskonstrukt zusätzlich um den konstitutiven *gpdA* Promotor (Punt *et al.*, 1991) erweitert. Überwiegend bei der industriellen Nutzung von *Aspergillus*-Stämmen zur Überproduktion von rekombinanten Enzymen, beispielsweise Lipasen oder Proteasen werden bereits Tandem- oder Hybrid-Promotoren eingesetzt, die auf der Kombination verschiedener Promotoren oder deren Elemente beruhen. Zu den vielversprechendsten Ansätzen zählen hier der Pna2/TPI Promotor, der eine Fusion aus dem Amylase II Promoter von *A. niger* (Pna2) und dem Triosephosphat-Isomerase-Promoter (TPI) aus *A. nidulans* darstellt, sowie der Enolase-Promotor (P-enoA) aus *A. oryzae* (Olempska-Beer *et al.*, 2006; Tsuboi *et al.*, 2005). Aber diese Kombination kann möglicherweise auch seine angestrebte Wirkung verfehlen. Sollte der Promotor von AN9226 nur eine geringe Aktivität zeigen oder gar reprimiert werden, beispielsweise aufgrund weniger oder anderer Response Elemente, kann dies dazu führen, dass auch der nachgeschaltete *gpdA* Promotor keine Erhöhung der Transkription bewirken kann, da sich dieser nicht in unmittelbarer Umgebung des Transkriptionsstartpunktes befindet. Aufgrund dieser Vermutung wurde der geneigene Promotorbereich deletiert und somit durch den *gpdA* Promotor unmittelbar ersetzt. Diese Strategie wurde bereits für zahlreiche *Aspergillus*-Spezies

und Promotoren erfolgreich verfolgt (Blumhoff *et al.*, 2013; Seshime *et al.*, 2010). Bisher konnten aber auch für diese Variante noch keine konditionell stabilen Transformanten erhalten werden, sie zeigten lediglich ein sehr eingeschränktes Wachstum auf entsprechendem Selektionsmedium. Auch die Nachweis-PCR erbrachte nicht das erwartete Ergebnis. Da aber auch hier unterschiedliche Faktoren, wie die Qualität der isolierten DNA der Transformanten, Inhibitoren und subjektive Fehler eine Rolle spielen, wurden die möglichen Transformanten zur Sekundärmetabolitproduktion kultiviert. Bei der Auswertung konnte noch ein weiterer zusätzlicher Peak im Sekundärmetabolitspektrum mit einer Retentionszeit von 22 min im Unterschied zum untransformierten Stamm detektiert werden. Diese Transformanten produzierten zwar nach wie vor Sterigmatocystin (**28a**), aber vergleichend zum zusätzlichen Sekundärmetabolit mit ähnlicher Intensität. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht zuletzt aufgrund der Wachstumsstagnation der Transformanten die Struktur nicht aufgeklärt werden. Da aber auch unbestätigte Transformanten mit der NRPS *NFIA\_043670* ein Produkt mit ähnlicher Retentionszeit aufzeigten, bleibt der Verdacht, dass dieses nicht mit der Geninsertion von *AN9226* im Zusammenhang steht. Durch die Erzeugung neuer Transformanten und deren Analyse könnte sich in naher Zukunft der gewünschte Erfolg einstellen.

### **5.2.2 Zielgerichtete Produktion von Sekundärmetaboliten durch die Kombination der NRPS FtmPS und Prenyltransferasen in *Aspergillus***

Ein weiteres Aufgabengebiet in der vorliegenden Arbeit bestand in der Koexpression des NRPS-Genes *ftmPS* (*NFIA\_093690*) aus *N. fischeri* mit verschiedenen Prenyltransferasegenen der DMATS-Superfamilie in *A. nidulans*. Hierbei sollten gezielt prenylierte Derivate von *cyclo*-L-Trp-L-Pro erzeugt und isoliert werden. Meine Arbeit bezog sich hierbei auf die Erstellung entsprechender Konstrukte zur Überproduktion der Nichtribosomalen Peptidsynthetase FtmPS und der Prenyltransferase CdpNPT in *A. nidulans*. Für FtmPS wurde ein Konstrukt auf Grundlage des Transformationsvektors pJW24 erstellt und für CdpNPT erfolgte die Modifikation des Vektors pHL5 (Yin *et al.*, 2007), welcher ursprünglich für die Verwendung in einem bakteriellen Expressionssystem vorgesehen war. Auf dieser Grundlage des Vektors pCaW34 wurden durch Frau Dr. Kathrin Mundt weitere Expressionskonstrukte für die Prenyltransferasen CdpC2PT, CdpC3PT und BrePT erstellt. Die Produktion von *cyclo*-L-Trp-L-

Pro (Brevianamid F) wurde bereits für die NRPS FtmA aus *A. fumigatus* bestätigt (Maiya *et al.*, 2006). Zur Reproduktion wurde das orthologe Gen *ftmPS* aus *N. fischeri* amplifiziert in pJW24 überführt und unter die Kontrolle des konstitutiven *gpdA* Promotors und *trpC* Terminators gestellt (Punt *et al.*, 1991). Der Austausch von Promotorbereichen brachte bereits in Verbindung mit anderen Genen des Sekundärmetabolismus (Lim *et al.*, 2012; Seshime *et al.*, 2010) den gewünschten Erfolg. Die beiden Enzyme FtmPS (FtmA) aus *N. fischeri* und *A. fumigatus* (Maiya *et al.*, 2006) zeigen zueinander 88 % Sequenzidentität auf Aminosäureebene auf und besitzen durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Adenylierungsdomänen mit dem NRSPredictor2 (Röttig *et al.*, 2011) auch die identischen spezifischen Aminosäurecodes (A<sub>1</sub>: D-V-M-F-I-G-A-V-N-K, A<sub>2</sub>: D-V-Y-F-V-G-G-I-C-K). Auch aus diesem Grund kann für FtmPS von der Akzeptanz für die erste Adenylierungsdomäne für L-Tryptophan und im Fall der zweiten Adenylierungsdomäne für L-Prolin ausgegangen werden (Ames & Walsh 2010). Nach der Transformation des NRPS-Genes *ftmPS* in *A. nidulans* TN02A7 konnten vier positive Transformanten identifiziert werden und zudem die *in vivo*-Produktion von *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**11a**) nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich Ausbeuten von 9,7 - 36,9 mg pro Liter Kultur.

Die für die weiterführende Transformation vorbereiteten Prenyltransferasekonstrukte verfügten dabei ebenfalls über den *gpdA* Promotor, *trpC* Terminator, sowie den *pyroA*-Selektionsmarker. Der Transformant *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) wurde daraufhin für die Koexpression der Prenyltransferasegene ausgewählt und mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transformiert. Diese Arbeit, sowie die Strukturaufklärung der erhaltenen Sekundärmetabolite wurde durch Frau Dr. Kathrin Mundt durchgeführt. Dabei konnten für *cdpNPT* zehn Transformanten (*A. nidulans* KM35 - KM44) identifiziert werden, die in Anlehnung zu den *in vitro* Analysen (Yu *et al.*, 2013) jeweils zwei Produktpeaks aufzeigten. Ein Hauptprodukt, welches als *syn-cis* revers C3-prenyliertes Derivat von *cyclo*-L-Trp-L-Pro (**11e**) bestätigt werden konnte und ein weiteres. Die Struktur des zweiten Produktes (**11d**) konnte aufgrund der geringen produzierten Mengen nicht mittels <sup>1</sup>H-NMR aufgeklärt werden, dennoch kann vermutet werden, dass es sich um das gesuchte *anti-cis* Derivat handelt, welches bei der *in vitro* Studie im Verhältnis 1:15 zum Hauptprodukt auftrat. Für das identifizierte Produkt (**11e**) konnten Ausbeuten von 1,1 - 2,8 mg pro Liter Kultur, für das zweite Produkt (**11d**) 1,0 - 3,5 mg pro Liter Kultur und für Brevianamid F Konzentrationen von 38,8 - 45,6 mg pro Liter Kultur bestimmt werden.

Zusammenfassend zeigten unsere *in vivo* Untersuchungen, dass die gewünschten prenylierten Derivate durch eine gezielte Koexpression von Grundgerüst-produzierenden Enzymen, wie NRPS (*ftmPS*) und modifizierenden Enzyme, wie Prenyltransferasen (*cdpC2PT*, *brePT*, *cdpNPT*, *cdpC3PT*) aus unterschiedlichen Biosyntheseclustern und Pilzen erhalten werden können. Die dabei angereicherten Sekundärmetabolite stimmten mit denen überein, welche durch *in vitro* Assays unter Verwendung der rekombinanten Proteine erzeugt wurden. Diese Ergebnisse erbringen somit den direkten Beweis dafür, dass die Resultate der *in vitro*-Charakterisierung für die Prenyltransferasen der letzten Jahre direkt auf die *in vivo* Produktion solcher Verbindungen übertragbar sind und es sich hierbei um ein geeignetes Mittel für die synthetische Mikrobiologie handelt. Der Nachweis der gleichen Metabolite spricht zudem für die metabolische Stabilität der erhaltenen Produkte, welches eine grundlegende Voraussetzung für eine weitere Umsetzung durch zusätzliche Modifikationsenzyme, wie Cytochrom P450-Enzyme oder Oxidoreduktasen darstellt. Intermediate von Biosynthesewegen zeigen sonst eher eine geringe Halbwertszeit (Gu *et al.*, 2013). Unter Einsatz dieser Methode können somit unterschiedliche Gene unter Einbezug regulatorischer Elemente zur Analyse ihrer Funktion heterolog exprimiert bzw. coexprimiert werden und ihre Funktion direkt in einem geeigneten Wirtsorganismus analysiert werden. Ausserdem kann durch die gezielte Kombination unterschiedlicher Enzymklassen auch die strukturelle Diversität und damit einhergehend die biologische Aktivität neu gewonnener Naturstoffe erhöht werden.

## 6 Referenzen

**Akashi, T., Sasaki, K., Aoki, T., Ayabe, S. & Yazaki, K. (2009).** Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. *Plant Physiol.* **149**, 683-693.

**Ali, H., Ries, M., Nijland, J. G., Lankhorst, P. P., Hankemeier, T., Bovenberg, R. A., Vreeken, R. J. & Driessen, A. J. (2013).** A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS One* **8**, e65328.

**Ames, B. D. & Walsh, C. T. (2010).** Anthranilate-activating modules from fungal nonribosomal peptide assembly lines. *Biochemistry* **49**, 3351-3365.

**Arai, K., Kimura, K., Mushiroda, T. & Yamamoto, Y. (1989).** Structures of fructigenines A and B, new alkaloids isolated from *Penicillium fructigenum* Takeuchi. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2937-2939.

**Arai, K., Sato, S., Shimizu, S., Nitta, K. & Yamamoto, Y. (1981).** Metabolic products of *Aspergillus terreus*. VII. Asteochrome: an iron-containing metabolite of the strain IFO 6123. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 1510-1517.

**Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. & Edwards, P. A. (1992).** COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4128-4136.

**Ashley, D. L., Orti, D. L. & Hill, R. H., Jr. (1987).** Proton nuclear magnetic resonance evidence for two configurations of the hemiacetals of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Sterigmatocystin. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 782-785.

**Balibar, C. J., Howard-Jones, A. R. & Walsh, C. T. (2007).** Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 584-592.

**Ballance, D. J., Buxton, F. P. & Turner, G. (1983).** Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 284-289.

**Barnes, S. E., Dola, T. P., Bennett, J. W. & Bhatnagar, D. (1994).** Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* **125**, 173-178.

**Bennett, J. W. & Klich, M. (2003).** Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497-516.

**Beuchat, L. R. (1986).** Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. *J. Food Science* **51**, 1506-1510.

**Birch, A. J., Blance, G. E., David, S. & Smith, H. (1961).** Studies in relation to biosynthesis. XXIV. Some remarks on the structure of echinuline. *J. Chem. Soc.* 3128-3131.

- Blumhoff, M., Steiger, M. G., Marx, H., Mattanovich, D. & Sauer, M. (2013).** Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 259-267.
- Boichenko, L. V., Boichenko, D. M., Vinokurova, N. G., Reshetilova, T. A. & Arinbasarov, M. U. (2001).** Screening for ergot alkaloid producers among microscopic fungi by means of the polymerase chain reaction. *Microbiology (Moscow)* **70**, 306-310.
- Bok, J. W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L. A., Murillo, R., Glasner, J. D. & Keller, N. P. (2006).** Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem. Biol.* **13**, 31-37.
- Bok, J. W. & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **3**, 527-535.
- Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L. (2011).** Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One* **6**, e27336.
- Bonitz, T., Zubeil, F., Grond, S. & Heide, L. (2013).** Unusual *N*-prenylation in diazepinomicin biosynthesis: The farnesylation of a menzodiazepine substrate is catalyzed by a new member of the ABBA prenyltransferase Superfamily. *PLoS One* **8**, e85707.
- Boruta, T. & Bizukoje, M. (2014).** Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnol.* **175**, 53-62.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005).** Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* **12**, 717-739.
- Bouhired, S., Weber, M., Kempf-Sontag, A., Keller, N. P. & Hoffmeister, D. (2007).** Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene cluster boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 1134-1145.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradshaw, R. E. (2006).** From protoplast to gene clusters. *Mycologist* **20**, 133-139.
- Brewer, D., Jen, W. C., Jones, G. A. & Taylor, A. (1984).** The antibacterial activity of some naturally occurring 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinones. *Can. J. Microbiol.* **30**, 1068-1072.
- Brown, D. W., Yu, J.-H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. & Leonard, T. J. (1996).** Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1418-1422.
- Caboche, S., Leclère, V., Pupin, M. & Kuchеров, G. (2010).** Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity. *J. Bacteriol.* **192**, 5143-5150.
- Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W. & Keller, N. P. (2004).** veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4733-4739.

**Challis, G. L. & Naismith, J. H. (2004).** Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 748-756.

**Chaudhuri, K. (2013).** *Recombinant DNA technology*, I., The Energy and Resources Institute (TERI).

**Chiang, Y. M., Oakley, C. E., Ahuja, M., Entwistle, R., Schultz, A., Chang, S. L., Sung, C. T., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2013).** An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7720-7731.

**Chooi, Y. H., Fang, J., Liu, H., Filler, S. G., Wang, P. & Tang, Y. (2013).** Genome mining of a prenylated and immunosuppressive polyketide from pathogenic fungi. *Org. Lett.* **15**, 780-783.

**Chooi, Y. H., Wang, P., Fang, J., Li, Y., Wu, K., Wang, P. & Tang, Y. (2012).** Discovery and characterization of a group of fungal polycyclic polyketide prenyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9428-9437.

**Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P. (1997).** Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16**, 4174-4183.

**Coriglione, G., Stella, G., Gafa, L., Spata, G., Oliveri, S., Padhye, A. A. & Ajello, L. (1990).** *Neosartorya fischeri* var *fischeri* (Wehmer) Malloch and Cain 1972 (anamorph: *Aspergillus fischerianus* Samson and Gams 1985) as a cause of mycotic keratitis. *Eur. J. Epidemiol.* **6**, 382-385.

**Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002).** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223-249.

**Deckwer, W. D., Pühler, A., Schmid, R. D., Bach, M., Rohlf, U., Frunder, B., Dieterich, S., Häusler, H., Wagenblast, K., Ackermann, W., Anspach, F. B. & Appel, B. (1999).** *Römp Lexikon - Biotechnologie und Gentechnik*, II., Thieme (Verlag).

**Dermoumi, H. (2009).** *Bestimmungsbuch für Pilze in der Medizin*, I., Lehmanns (Verlag).

**Ding, Y., Wet, J. R., Cavalcoli, J., Li, S. et al. (2010).** Genome-based characterization of two prenylation steps in the assembly of the stephacidin and notoamide anticancer agents in a marine-derived *Aspergillus* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12733-12740.

**Ding, Y., Williams, R. M. & Sherman, D. H. (2008).** Molecular analysis of a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Malbranchea aurantiaca*. *J. Biol. Chem.* **283**, 16068-16076.

**Drake, E. J., Nicolai, D. A. & Gulick, A. M. (2006).** Structure of the EntB multidomain nonribosomal peptide synthetase and functional analysis of its interaction with the EntE adenylation domain. *Chem. Biol.* **13**, 409-419.

**Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004).** Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11432-11433.



- Facchini, P. J., Penzes, C., Johnson, A. G. & Bull, D. (1996).** Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiol.* **112**, 1669-1677.
- Fakruddin, Md., Mazumdar, R. M., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A. & Nur Hossain, Md. (2013).** Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnol.* **2013**, Article ID 590587.
- Fan, A., Chen, H., Wu, R., Xu, H. & Li, S.-M. (2014).** A new member of the DMATS superfamily from *Aspergillus niger* catalyzes prenylations of both tyrosine and tryptophan derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-014-5872-7.
- Fan, A. & Li, S.-M. (2013).** One substrate - seven products with different prenylation positions in one-step reactions: prenyltransferases make it possible. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 2659-2666.
- Fan, A. & Li, S.-M. (2014).** Prenylation of Tyrosine and Derivatives by a Tryptophan C7-prenyltransferase. *Tetrahedron Lett.* **55**, 5199-5202.
- Fedorova, N. D., Khaldi, N., Joardar, V. S., Maiti, R. et al. (2008).** Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* **4**, e1000046.
- Franck, B. & Gehrken, H. P. (1980).** Citreoviridins from *Aspergillus terreus*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19**, 461-462.
- Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F. & Larsen, T. O. (2009).** Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **47**, 53-71.
- Fulmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., Bercaw, J. E. & Goldberg, K. I. (2010).** NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* **29**, 2176-2179.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J. et al. (2005).** Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115.
- Gao, H., Guo, W., Wang, Q., Zhang, L., Zhu, M., Zhu, T., Gu, Q., Wang, W. & Li, D. (2013a).** Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 1776-1778.
- Gao, X., Haynes, S. W., Ames, B. D., Wang, P., Vien, L. P., Walsh, C. T. & Tang, Y. (2012).** Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 823-830.
- Gao, X., Jiang, W., Jimenez-Oses, G., Choi, M. S., Houk, K. N., Tang, Y. & Walsh, C. T. (2013b).** An iterative, bimodular nonribosomal peptide synthetase that converts anthranilate and tryptophan into tetracyclic asperlicins. *Chem. Biol.* **20**, 870-878.
- García-Estrada, C., Ullán, R. V., Álbillos, S. M., Fernández-Bodega, M. A., Durek, P., von, D. H. & Martín, J. F. (2011).** A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* **18**, 1499-1512.

- Gehring, A. M., DeMoll, E., Fetherston, J. D., Mori, I., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., Walsh, C. T. & Perry, R. D. (1998). Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* **5**, 573-586.
- Gelb, M. H., Brunsveld, L., Hrycyna, C. A., Michaelis, S., Tamanoi, F., Van Voorhis, W. C. & Waldmann, H. (2006). Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 518-528.
- Goldman, G. H. & Osmani, S. A. (2007). The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods. **26**, CRC Press.
- Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullo, S. S. & Li, S.-M. (2008). FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* **9**, 2059-2063.
- Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.
- Gu, B., He, S., Yan, X. & Zhang, L. (2013). Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8439-8453.
- Guo, C. J., Knox, B. P., Chiang, Y. M., Lo, H. C., Sanchez, J. F., Lee, K. H., Oakley, B. R., Bruno, K. S. & Wang, C. C. (2012). Molecular genetic characterization of a cluster in *A. terreus* for biosynthesis of the meroterpenoid terretonin. *Org. Lett.* **14**, 5684-5687.
- Guo, C. J., Knox, B. P., Sanchez, J. F., Chiang, Y. M., Bruno, K. S. & Wang, C. C. (2013). Application of an efficient gene targeting system linking secondary metabolites to their biosynthetic genes in *Aspergillus terreus*. *Org. Lett.* 3562-3565.
- Haagen, Y., Unsöld, I., Westrich, L., Gust, B., Richard, S. B., Noel, J. P. & Heide, L. (2007). A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates. *FEBS Lett.* **581**, 2889-2893.
- Haas, H., Schoeser, M., Lesuisse, E., Ernst, J. F., Parson, W., Abt, B., Winkelmann, G. & Oberegger, H. (2003). Characterization of the *Aspergillus nidulans* transporters for the siderophores enterobactin and triacetylufusarinine C. *Biochem. J.* **371**, 505-513.
- Hajjaj, H., Niederberger, P. & Duboc, P. (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2596-2602.
- Haug-Schifferdecker, E., Arican, D., Brueckner, R. & Heide, L. (2010). A new group of aromatic prenyltransferases in fungi, catalyzing a 2,7-dihydroxynaphthalene dimethylallyltransferase reaction. *J. Biol. Chem.* **285**, 16487-16494.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **105**, 1422-1432.
- Haynes, S. W., Gao, X., Tang, Y. & Walsh, C. T. (2013). Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: A two-enzyme pathway to the hexacyclic MDR export pump inhibitor ardeemin. *ACS Chem. Biol.* **8**, 741-748.

- Heide, L. (2009).** Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 171-179.
- Hochlowski, J. E., Mullally, M. M., Spanton, S. G., Whittern, D. N., Hill, P. & McAlpine, J. B. (1993).** 5-N-acetylardeemin, a novel heterocyclic compound which reverses multiple drug resistance in tumor cells. II. Isolation and elucidation of the structure of 5-N-acetylardeemin and two congeners. *J. Antibiot.* **46**, 380-386.
- Hof, H. & Dörries, R. (2014).** *Medizinische Mikrobiologie*, V., Thieme (Verlag).
- Hoffmeister, D. & Keller, N. P. (2007).** Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 393-416.
- Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K. & Reichenbach, H. (1996).** Epothilon A und B - neuartige, 16-gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung. *Angew. Chem.* **108**, 1671-1673.
- Itabashi, T., Matsuishi, N., Hosoe, T., Toyazaki, N., Udagawa, S., Imai, T., Adachi, M. & Kawai, K. (2006).** Two new dioxopiperazine derivatives, arestrictins A and B, isolated from *Aspergillus restrictus* and *Aspergillus penicilloides*. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 1639-1641.
- Iwen, P. C., Rupp, M. E., Langnas, A. N., Reed, E. C. & Hinrichs, S. H. (1998).** Invasive pulmonary Aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1092-1097.
- Jain, H. D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H. et al. (2008).** Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4626-4651.
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000).** Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.
- Jost, M., Zocher, G., Tarcz, S., Matuschek, M., Xie, X., Li, S.-M. & Stehle, T. (2010).** Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17849-17858.
- Kagamizono, T., Sakai, N., Arai, K., Kobinata, K. & Osada, H. (1997).** Terpeptin, a novel mammalian cell cycle inhibitor, produced by *Aspergillus terreus* 95F-1. *Tetrahedron Lett.* **38**, 1223-1226.
- Kaji, A., Iwata, T., Kiriya, N., Wakusawa, S. & Miyamoto, K. (1994).** Four new metabolites of *Aspergillus terreus*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1682-1684.
- Kalb, D., Lackner, G. & Hoffmeister, D. (2013).** Fungal peptide synthetases: an update on functions and specificity signatures. *Fungal Biol. Rev.* **27**, 43-50.
- Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y. et al. (2009).** Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **10**, 920-928.

- Keller, N., Bok, J., Chung, D., Perrin, R. M. & Keats, S. E. (2006). LaeA, a global regulator of *Aspergillus* toxins. *Med. Mycol.* **44**, 83-85.
- Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937-947.
- Khalidi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. & Fedorova, N. D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 736-741.
- Kimura, Y., Hamasaki, T., Nakajima, H. & Isogai, A. (1982). Structure of aszonalenin, a new metabolite of *Aspergillus zonatus*. *Tetrahedron Lett.* **23**, 225-228.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the fungi*, X., CABI / CSIRO Publishing.
- Kofla, G. & Ruhnke, M. (2011). Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis - review of the literature. *Europ. J. Med. Research* **16**, 159-166.
- Koglin, A., Lohr, F., Bernhard, F., Rogov, V. V. et al. (2008). Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature* **454**, 907-911.
- Korbie, D. J. & Mattek, J. (2008). Touchdown PCR for increases specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* **3**, 1452-1456.
- Kozlovsky, A. G., Zhelifonova, V. P. & Antipova, T. V. (2013). Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **49**, 1-10.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H. M. & Gräfe, U. (2000). New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **63**, 698-700.
- Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H.-M. & Gräfe, U. (2001). New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **64**, 553-554.
- Kreader, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1102-1106.
- Kremer, A. & Li, S.-M. (2010). A tyrosine O-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* **156**, 278-286.
- Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M. (2007). A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* **153**, 3409-3416.
- Kück, U. & Hoff, B. (2010). New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 51-62.
- Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B. & Engh, I. (2009). *Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*, III., Springer (Verlag).

- Kumano, T., Richard, S. B., Noel, J. P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2008).** Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8117-8126.
- Kumano, T., Tomita, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2010).** Functional characterization of the promiscuous prenyltransferase responsible for furaquinocin biosynthesis: identification of a physiological polyketide substrate and its prenylated reaction products. *J. Biol. Chem.* **285**, 39663-39671.
- Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005).** Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983-987.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lass-Flörl, C., Griff, K., Mayr, A., Petzer, A. et al. (2005).** Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Brit. J. Haematol.* **131**, 201-207.
- Li, S.-M. (2010).** Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 57-78.
- Li, Y., Weissman, K. J. & Müller, R. (2008).** Myxochelin biosynthesis: Direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7554-7555.
- Liang, P. H. (2009).** Reaction kinetics, catalytic mechanisms, conformational changes, and inhibitor design for prenyltransferases. *Biochemistry* **48**, 6562-6570.
- Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H. (2002).** Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3339-3354.
- Liebhold, M. & Li, S.-M. (2013).** Regiospecific benzylation of tryptophan and derivatives catalyzed by a fungal dimethylallyl transferase. *Org. Lett.* **15**, 5834-5837.
- Liebhold, M., Xie, X. & Li, S.-M. (2012).** Expansion of enzymatic Friedel-Crafts alkylation on indoles: Acceptance of unnatural beta-unsaturated allyl diphosphates by dimethylallyl-tryptophan synthases. *Org. Lett.* **14**, 4884-4885.
- Liebhold, M., Xie, X. & Li, S.-M. (2013).** Breaking cyclic dipeptide prenyltransferase regioselectivity by unnatural alkyl donors. *Org. Lett.* **15**, 3062-3065.
- Lim, F. Y., Sanchez, J. F., Wang, C. C. & Keller, N. P. (2012).** Chapter fifteen - Toward awakening cryptic secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. In *Methods in Enzymology. Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part C*, **517**; Academic Press.
- Ling, C.-S. (2013).** Synthesis and antioxidant activity of prenylated xanthenes derived from 1,3,6-trihydroxyxanthone. *Bachelor thesis Universiti Tunku Abdul Rahman*.

- Liu, X. & Walsh, C. T. (2009).** Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies. *Biochemistry* **48**, 11032-11044.
- Lonial, S., Williams, L., Carrum, G., Ostrowski, M. & McCarthy, P. Jr. (1997).** *Neosartorya fischeri*: an invasive fungal pathogen in an allogeneic bone marrow transplant patient. *Bone Marrow Transplant.* **19**, 753-755.
- Machida, M. & Gomi, K. (2010).** *Aspergillus: Molecular biology and genomics*, I., Horizon Scientific Press.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2006).** The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem* **7**, 1062-1069.
- Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2009).** Improved tryprostatin B production by heterologous gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 436-440.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997).** Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2674.
- Marchelli, R., Dossena, A. & Casnati, G. (1975).** Biosynthesis of neoechinulin by *Aspergillus amstelodami* from cyclo-L-[U-14C]alanyl-L-[5,7-3H<sub>2</sub>]tryptophyl. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **19**, 779-780.
- Markert, A., Steffan, N., Ploss, K., Hellwig, S., Steiner, U., Drewke, C., Li, S.-M., Boland, W. & Leistner, E. (2008).** Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a Clavicipitalean fungus. *Plant Physiol.* **147**, 296-305.
- Mattern, I. E., Noort, J. M., Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N. & Hondel, C. A. M. J. (1992).** Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 332-336.
- Maurer-Stroh, S., Washietl, S. & Eisenhaber, F. (2003).** Protein prenyltransferases. *Genome Biol.* **4**, 212.
- Melzer, M. & Heide, L. (1994).** Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 93-102.
- Metzger, U., Schall, C., Zocher, G., Unsöld, I., Stec, E., Li, S.-M., Heide, L. & Stehle, T. (2009).** The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14309-14314.
- Miyamoto, K., Ishikawa, F., Nakamura, S., Hayashi, Y., Nakanishi, I. & Kakeya, H. (2014).** A 7-dimethylallyl tryptophan synthase from a fungal *Neosartorya* sp.: Biochemical characterization and structural insight into the regioselective prenylation. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2517-2528.

- Mocek, U., Schultz, L., Buchan, T., Baek, C., Fretto, L., Nzerem, J., Sehl, L. & Sinha, U. (1996).** Isolation and structure elucidation of five new asterriquinones from *Aspergillus*, *Humicola* and *Botryotrichum* species. *J. Antibiot.* **49**, 854-859.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1997).** The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**, 6843-6850.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2002).** Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **3**, 490-504.
- Mundt, K. & Li, S.-M. (2013).** CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases. *Microbiology* **159**, 2169-2179.
- Mundt, K., Wollinsky, B., Ruan, H. L., Zhu, T. & Li, S.-M. (2012).** Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches. *Chembiochem* **13**, 2583-2592.
- Nakagawa, K., Hirota, Y., Sawada, N., Yuge, N. et al. (2010).** Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* **468**, 117-121.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557-1566.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L. R. & Frisvad, J. C. (1988).** Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1504-1510.
- Noike, M., Liu, C., Ono, Y., Hamano, Y., Toyomasu, T., Sassa, T., Kato, N. & Dairi, T. (2012).** An enzyme catalyzing O-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem* **13**, 566-573.
- O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T. & Frisvad, J. C. (2006).** Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9268-9276.
- Ogura, K. & Koyama, T. (1998).** Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276.
- Ohara, K., Mito, K. & Yazaki, K. (2013).** Homogeneous purification and characterization of LePGT1 - a membrane-bound aromatic substrate prenyltransferase involved in secondary metabolism of *Lithospermum erythrorhizon*. *FEBS J.* **280**, 2572-2580.
- Ohara, K., Muroya, A., Fukushima, N. & Yazaki, K. (2009).** Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of p-hydroxybenzoic acid. *Biochem. J.* **421**, 231-241.

- Ohara, K., Yamamoto, K., Hamamoto, M., Sasaki, K. & Yazaki, K. (2006).** Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* **47**, 581-590.
- Ola, A. R. B., Debbab, A., Aly, A. H., Mandi, A. et al. (2014).** Absolute configuration and antibiotic activity of neosartorin from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*. *Tetrahedron Lett.* **55**, 1020-1023.
- Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D. & DiNovi, M. J. (2006).** Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **45**, 144-158.
- Ondeyka, J. G., Dombrowski, A. W., Polishook, J. P., Felcetto, T., Shoop, W. L., Guan, Z. & Singh, S. B. (2003).** Isolation and insecticidal activity of mellamide from *Aspergillus melleus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 220-224.
- Osbourn, A., Goss, R. J. & Carter, G. T. (2014).** *Natural Products: Discourse, diversity, and design*, I., John Wiley & Sons Inc.
- Ottow, J. C. G. (2011).** *Mikrobiologie von Böden - Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik*, XV., Springer (Verlag).
- Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2009).** NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot.* **62**, 385-392.
- Ozaki, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2013).** Novel tryptophan metabolism by a potential gene cluster that is widely distributed among actinomycetes. *J. Biol. Chem.* **288**, 9946-9956.
- Perrin, R. M., Fedorova, N. D., Bok, J. W., Cramer, R. A., Wortman, J. R., Kim, H. S., Nierman, W. C. & Keller, N. P. (2007).** Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* **3**, e50.
- Pockrandt, D. & Li, S.-M. (2013).** Geranylation of cyclic dipeptides by the dimethylallyl transferase AnaPT resulting in a shift of prenylation position on the indole ring. *Chembiochem* **14**, 2023-2028.
- Pockrandt, D., Ludwig, L., Fan, A., König, G. M. & Li, S.-M. (2012).** New insights into the biosynthesis of prenylated xanthenes: XptB from *Aspergillus nidulans* catalyses an O-prenylation of xanthenes. *Chembiochem* **13**, 2764-2771.
- Pockrandt, D., Sack, C., Kosiol, T. & Li, S.-M. (2014).** A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyses C-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4987-4994.
- Pohlmann, V. & Marahiel, M. A. (2008).** Delta-amino group hydroxylation of L-ornithine during coelichelin biosynthesis. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 1843-1848.
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L. (2003).** CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2316-2321.



- Punt, P. J., Dingemanse, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. (1990).** Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**, 101-109.
- Punt, P. J., Zegers, N. D., Busscher, M., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. (1991).** Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *J. Biotechnol.* **17**, 19-33.
- Raju, R., Piggott, A. M., Huang, X. C. & Capon, R. J. (2011).** Nocardioazines: a novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits p-glycoprotein. *Org. Lett.* **13**, 2770-2773.
- Rank, C., Phipps, R. K., Harris, P., Frisvad, J. C., Gottfredsen, C. H. & Larsen, T. O. (2006).** *epi*-Aszonalenins A, B, and C from *Aspergillus novofumigatus*. *Tetrahedron Lett.* **47**, 6099-6102.
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W. & Huson, D. (2007).** Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol. Biol.* **7**, 78.
- Rochfort, S. J., Moore, S., Craft, C., Martin, N. H., Van Wagoner, R. M. & Wright, J. L. (2009).** Further studies on the chemistry of the flustra alkaloids from the bryozoan *Flustra foliacea*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1773-1781.
- Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. (2014).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. in Microbiol.* **5**, Article 172.
- Roskoski, R. J. (2003).** Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochem. Biophys. Research Comm.* **303**, 1-7.
- Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011).** NRPSpredictor2 - a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* **39**, W362-W367.
- Rudolf, J. D. & Poulter, C. D. (2013).** Tyrosine O-prenyltransferase SirD catalyzes S-, C-, and N-prenylations on tyrosine and tryptophan derivatives. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2707-2714.
- Ruiz-Sanchis, P., Savina, S. A., Albericio, F. & Alvarez, M. (2011).** Structure, bioactivity and synthesis of natural products with hexahydropyrrolo[2,3-b]indole. *Chemistry* **17**, 1388-1408.
- Sabater-Vilar, M., Nijmeijer, S. & Fink-Gremmels, J. (2003).** Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen, and verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *J. Food Prot.* **66**, 2123-2129.
- Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P., Antranikian & Takors, R. (2013).** *Industrielle Mikrobiologie, XII.*, Springer (Verlag).
- Saida, F., Uzan, M., Odaert, B. & Bontems, F. (2006).** Expression of highly toxic genes in *E. coli*: Special strategies and genetic tools. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 47-56.
- Saitoh, K., Togashi, K., Arie, T. & Teraoka, T. (2006).** A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J. Gen. Plant. Pathol.* **72**, 348-350.

- Sakai, K., Kinoshita, H. & Nihira, T. (2012).** Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 2011-2022.
- Saleh, O., Gust, B., Boll, B., Fiedler, H.-P. & Heide, L. (2009a).** Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis: dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from *Streptomyces anulatus*. *J. Biol. Chem.* **284**, 14439-14447.
- Saleh, O., Haagen, Y., Seeger, K. & Heide, L. (2009b).** Prenyl transfer to aromatic substrates in the biosynthesis of aminocoumarins, meroterpenoids and phenazines: The ABBA prenyltransferase family. *Phytochemistry*. **70**, 1728-1738.
- Sallam, L. A., El-Refai, A. M., Hamdy, A. H., El-Minofi, H. A. & Abdel-Salam, I. S. (2003).** Role of some fermentation parameters on cyclosporin A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 321-328.
- Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007).** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud. Mycol.* **59**, 147-203.
- Samson, R. A., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2011).** New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Stud. Mycol.* **69**, 39-55.
- Sanchez, J. F., Entwistle, R., Hung, J. H., Yaegashi, J., Jain, S., Chiang, Y. M., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2011).** Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4010-4017.
- Sasaki, K., Mito, K., Ohara, K., Yamamoto, H. & Yazaki, K. (2008).** Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.* **146**, 1075-1084.
- Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H. & Yazaki, K. (2011).** Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*. *J. Biol. Chem.* **286**, 24125-24134.
- Schneider, P., Bouhired, S. & Hoffmeister, D. (2008a).** Characterization of the atromentin biosynthesis genes and enzymes in the homobasidiomycete *Tapinella panuoides*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1487-1496.
- Schneider, P., Weber, M. & Hoffmeister, D. (2008b).** The *Aspergillus nidulans* enzyme TdiB catalyzes prenyltransfer to the precursor of bioactive asterriquinones. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 302-309.
- Schuller, J. M., Zocher, G., Liebhold, M., Xie, X., Stahl, M., Li, S.-M. & Stehle, T. (2012).** Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity. *J. Mol. Biol.* **422**, 87-99.
- Schultz, A. W., Lewis, C. A., Luzung, M. R., Baran, P. S. & Moore, B. S. (2010).** Functional characterization of the cyclomarin/cyclomarine prenyltransferase CymD directs the biosynthesis of unnatural cyclic peptides. *J. Nat. Prod.* **73**, 373-377.

**Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2003).** Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 275-287.

**Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U. & Marahiel, M. A. (2002).** Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14083-14088.

**Seeger, K., Flinspach, K., Haug-Schifferdecker, E., Kulik, A., Gust, B., Fiedler, H. P. & Heide, L. (2011).** The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Microb. Biotechnol.* **4**, 252-262.

**Segal, B. H., DeCarlo, E. S., Kwon-Chung, K. J., Malech, H. L., Gallin, J. I. & Holland, S. M. (1998).** *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* **77**, 345-354.

**Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Kitamoto, K., Ebizuka, Y. & Fujii, I. (2010).** Identification of csypyrone B1 as the novel product of *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyB. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 4542-4546.

**Shiono, Y., Akiyama, K. & Hayashi, H. (1999).** New okaramine congeners, okaramines J, K, L, M and related compounds, from *Penicillium simplicissimum* ATCC 90288. *Biosci. Biotechn. Biochem.* **63**, 1910-1920.

**Slater, G. P., MacDonald, J. C. & Nakashima, R. (1970).** Biosynthesis of echinulin by *Aspergillus amstelodami* from cyclo-L-alanyl-L-tryptophyl-14C. *Biochemistry* **9**, 2886-2889.

**Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C. & Pandey, A. (2006).** New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 141-149.

**Speth, C., Rambach, G., Würzner, R. & Lass-Flörl, C. (2008).** Complement and fungal pathogens: an update. *Mycoses* **51**, 477-496.

**Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (1995).** Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14.

**Stec, E., Pistorius, D., Müller, R. & Li, S.-M. (2011).** AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins. *Chembiochem* **12**, 1724-1730.

**Steffan, N. (2009).** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von Mykotoxinen aus Ascomyceten. *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.

**Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A. & Li, S.-M. (2009a).** Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Curr. Med. Chem.* **16**, 218-231.

**Steffan, N., Grundmann, A., Afiyatullo, A., Ruan, H. & Li, S.-M. (2009b).** FtmOx1, a non heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4082-4087.

- Steffan, N. & Li, S.-M. (2009).** Increasing structure diversity of prenylated diketopiperazine derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase. *Arch. Microbiol.* **191**, 461-466.
- Steinbach, W. J., Benjamin, D. K., Kontoyiannis, D. P., Perfect, J. R. et al. (2004).** Infections due to *Aspergillus terreus*: A multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 192-198.
- Stipanovic, R. D. & Schroeder, H. W. (1976).** Preechinulin, a metabolite of *Aspergillus chevalieri*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**, Part 1, 178-179.
- Stocking, E. M., Williams, R. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000).** Reverse prenyl transferases exhibit poor facial discrimination in the biosynthesis of paraherquamide A, brevianamide A, and austamide. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9089-9098.
- Stone, M. J. & Williams, D. H. (1992).** On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol. Microbiol.* **6**, 29-34.
- Subramanian, S., Shen, X., Yuan, Q. & Yan, Y. (2012).** Identification and biochemical characterization of a 5-dimethylallyltryptophan synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Process Biochem.* **47**, 1419-1422.
- Summerbell, R. C., de Repentigny, L., Chartrans, C. & St.Germain, G. (1992).** Graft-related endocarditis caused by *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 1580-1582.
- Svarstad, H., Bugge, H. C. & Dhillion, S. S. (2000).** From Norway to Novartis: cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. *Biodivers. Conserv.* **9**, 1521-1541.
- Takahashi, S. & Koyama, T. (2006).** Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes. *Chem. Rec.* **6**, 194-205.
- Takahashi, S., Takagi, H., Toyoda, A., Uramoto, M., Nogawa, T., Ueki, M., Sakaki, Y. & Osada, H. (2010).** Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* **192**, 2839-2851.
- Talapatra, S. K., Mandal, S. K., Bhaumik, A., Mukhopadhyay, S., Kar, P., Patra, A. & Talapatra, B. (2001).** Echinulin, a novel cyclic dipeptide carrying a triprenylated indole moiety from an Anacardiaceae, a Cucurbitaceae and two Orchidaceae plants: detailed high resolution 2D-NMR and mass spectral studies. *J. Indian Chem. Soc.* **78**, 773-777.
- Tarcz, S., Ludwig, L. & Li, S.-M. (2014a).** AstPT catalyses both reverse *N1*- and regular *C2*-prenylation of a methylated bisindolyl benzoquinone. *Chembiochem* **15**, 108-116.
- Tarcz, S., Xie, X. & Li, S.-M. (2014b).** Substrate and catalytic promiscuity of secondary metabolite enzymes: *O*-prenylation of hydroxyxanthenes with different prenyl donors by a bisindolyl benzoquinone *C*- and *N*-prenyltransferase. *RSC Adv.* **4**, 17986-17992.
- Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D. & Sacchettini, J. C. (1994).** Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 10871-10877.

- Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2008).** The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 1459-1463.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. & Davies, R. W. (1983).** Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. & Varshavsky, A. (1991).** The N-end rule in bacteria. *Science* **254**, 1374-1377.
- Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. (1995).** The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 119-125.
- Tsuboi, H., Koda, A., Toda, T., Minetoki, T., Hirotsume, M. & Machida, M. (2005).** Improvement of the *Aspergillus oryzae* enolase promoter (P-enoA) by the introduction of cis-element repeats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **69**, 206-208.
- Tsunematsu, Y., Ishikawa, N., Wakana, D., Goda, Y., Noguchi, H., Moriya, H., Hotta, K. & Watanabe, K. (2013).** Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 818-825.
- Twumasi-Boateng, K., Yu, Y., Chen, D., Gravelat, F. N., Nierman, W. C. & Sheppard, D. C. (2009).** Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **8**, 104-115.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 1499-1505.
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006).** Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164.
- Usui, T., Kondoh, M., Cui, C. B., Mayumi, T. & Osada, H. (1998).** Tryprostatin A, a specific and novel inhibitor of microtubule assembly. *Biochem. J.* **333**, 543-548.
- van Wageningen, A. M., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. & Solenberg, P. J. (1998).** Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* **5**, 155-162.
- von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. (1997).** Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem. Rev.* **97**, 2675-2705.
- Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011).** Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 496-510.
- Walsh, C. T., Haynes, S. W., Ames, B. D., Gao, X. & Tang, Y. (2013).** Short pathways to complexity generation: Fungal peptidyl alkaloid multicyclic scaffolds from anthranilate building blocks. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1366-1382.

- Walsh, T. J., Petraitis, V., Petraitiene, R., Field-Ridley, A. et al. (2003).** Experimental pulmonary Aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: Pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to Amphotericin B. *J. Infect. Dis.* **188**, 305-319.
- Wang, K. C. & Ohnuma, S. (2000).** Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) - Mol. and Cell Biol. of Lipids* **1529**, 33-48.
- Wang, M. & Zhao, H. (2014).** Characterization and engineering of the adenylation domain of a NRPS-Like protein: A potential biocatalyst for aldehyde generation. *ACS Catalysis* **4**, 1219-1225.
- Wang, W. L., Lu, Z. Y., Tao, H. W., Zhu, T. J., Fang, Y. C., Gu, Q. Q. & Zhu, W. M. (2007).** Isoechinulin-type alkaloids, variecolorins A-L, from halotolerant *Aspergillus variecolor*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1558-1564.
- Wang, Y., Gloer, J. B., Scott, J. A. & Malloch, D. (1995).** Tereazines A-D: New amino acid-derived bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella teretispora*. *J. Nat. Prod.* **58**, 93-99.
- Webster, J. & Weber, R. W. S. (2007).** *Introduction to Fungi*, III., Cambridge University Pres.
- Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000).** Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* **209**, 97-173.
- Wilson, D. M. (1976).** Patulin and penicillic acid. In *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*, **149**; American Chemical Society.
- Winkelblech, J. & Li, S.-M. (2014).** Biochemical investigations of two 6-DMATS enzymes from *Streptomyces* revealing novel features of L-tryptophan prenyltransferases. *Chembiochem* **15**, 1030-1039.
- Wollinsky, B., Ludwig, L., Hamacher, A., Yu, X., Kassack, M. U. & Li SM (2012a).** Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3866-3869.
- Wollinsky, B., Ludwig, L., Hamacher, A., Yu, X., Kassack, M. U. & Li, S.-M. (2012b).** Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3866-3869.
- Wollinsky, B., Ludwig, L., Xie, X. & Li, S.-M. (2012c).** Breaking the regioselectivity of indole prenyltransferases: identification of regular C3-prenylated hexahydropyrrolo[2,3-b]indoles as side products of the regular C2-prenyltransferase FtmPT1. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9262-9270.
- Wunsch, C., Zou, H. X., Linne, U. & Li, S.-M. (2014).** C7-prenylation of tryptophanyl and O-prenylation of tyrosyl residues in dipeptides by an *Aspergillus terreus* prenyltransferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-014-5999-6.
- Xu, W., Gavia, D. J. & Tang, Y. (2014).** Biosynthesis of fungal indole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 1474-1487.

- Yamamoto, Y., Nishimura, K. & Kiriya, N. (1976).** Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus*. I. Metabolites of the strain IFO 6123. *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1853-1859.
- Yazaki, K., Kuniyoshi, M., Fujisaki, T. & Sato, F. (2002).** Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 6240-6246.
- Yeh, E., Kohli, R. M., Bruner, S. D. & Walsh, C. T. (2004).** Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *Chembiochem* **5**, 1290-1293.
- Yeh, H. H., Chiang, Y. M., Entwistle, R., Ahuja, M., Lee, K. H., Bruno, K. S., Wu, T. K., Oakley, B. R. & Wang, C. C. (2012).** Molecular genetic analysis reveals that a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene in *Aspergillus nidulans* is responsible for microperforanone biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 739-748.
- Yin, S., Yu, X., Wang, Q., Liu, X. Q. & Li, S.-M. (2013a).** Identification of a brevianamide F reverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1649-1660.
- Yin, W. B., Amaike, S., Wohlbach, D. J., Gasch, A. P., Chiang, Y. M., Wang, C. C., Bok, J. W., Rohlf, M. & Keller, N. P. (2012).** An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Mol. Microbiol.* **83**, 1024-1034.
- Yin, W.-B., Baccile, J. A., Bok, J. W., Chen, Y., Keller, N. P. & Schroeder, F. C. (2013b).** A nonribosomal peptide synthetase-derived iron(III) complex from the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2064-2067.
- Yin, W.-B., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009a).** Stereospecific synthesis of aszonalenins by using two recombinant prenyltransferases. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2202-2207.
- Yin, W.-B., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009b).** Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J. Biol. Chem.* **284**, 100-109.
- Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. & Li, S.-M. (2007).** CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation. *Chembiochem* **8**, 1154-1161.
- Yin, W.-B., Xie, X.-L., Matuschek, M. & Li, S.-M. (2010a).** Reconstruction of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying an  $\alpha$ -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using recombinant enzymes. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1133-1141.
- Yin, W.-B., Yu, X., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010b).** Preparation of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying a  $\beta$ -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using a recombinant prenyltransferase CdpC3PT. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 2430-2438.
- Yu, X., Yang, A., Lin, W. & Li, S.-M. (2012a).** Friedel-Crafts alkylation on indolocarbazoles catalyzed by two dimethylallyltryptophan synthases from *Aspergillus*. *Tetrahedron Lett.* **53**, 6861-6864.

- Yu, X. & Li, S.-M. (2011).** Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyltryptophan synthase 7-DMATS from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **12**, 2280-2283.
- Yu, X. & Li, S.-M. (2012).** Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Methods Enzymol.* **516**, 259-278.
- Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2012b).** Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 1371-1380.
- Yu, X., Xie, X. & Li, S.-M. (2011).** Substrate promiscuity of secondary metabolite enzymes: prenylation of hydroxynaphthalenes by fungal indole prenyltransferases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 737-748.
- Yu, X., Zocher, G., Xie, X., Liebhold, M., Schütz, S., Stehle, T. & Li, S.-M. (2013).** Catalytic mechanism of stereospecific formation of *cis*-configured prenylated pyrroloindoline diketopiperazines by indole prenyltransferases. *Chem. Biol.* **20**, 1492-1501.
- Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z. et al. (1999).** Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science (Washington, D. C. )* **284**, 974-977.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. (2004).** An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115.
- Zocher, G., Saleh, O., Heim, J. B., Herbst, D. A., Heide, L. & Stehle, T. (2012).** Structure-based engineering increased the catalytic turnover rate of a novel phenazine prenyltransferase. *PLoS One.* **7**, e48427.
- Zou, H.-X., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2011).** The tyrosine O-prenyltransferase SirD catalyzes O-, N-, and C-prenylations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1443-1451.
- Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2010).** Simultaneous C7- and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3037-3044.
- Zverina, E. A., Lamphear, C. L., Wright, E. N. & Fierke, C. A. (2012).** Recent advances in protein prenyltransferases: substrate identification, regulation, and disease interventions. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **16**, 544-552.



## 7 Anhang

### 7.1 Multi-Proteinsequenzvergleiche ausgewählter Prenyltransferasen zur Unterstützung der Intron-Exon Vorhersage

#### 7.1.1 Multi-Proteinsequenzvergleiche mit CdpC7PT und EAU38487

BrePT	-----MTAPELRAPAGHPQEP- PARSS-----	PAQALSSYHHFPT--SDQERWYQETGSLC	48
CdpC2PT	-----MAINSRCLACKRHSESGAEYINRVTLT-----	PIEALARYWTSPT--EHHTQWQNDTAPLF	56
CdpC7PT	MANRVSNPDPAVSQNEVQAARPDIAQNTDNVDST	-----PYRILTQFLTFFPD--EAGKGWEDSGSLF	62
FgaPT2	-----MKAANASSAE-----	AYRVLSRAFRFDN--EDQKLWWHSTAPMF	37
MaPT	-----MSTTESLTASHQA-----	VYKTLSDVFEFSN--DDQKLWWHSTAPMF	40
FtmPT2	-----MTIPTETSCPEED-----	AFQLLDKFSWFPS--DDQRRWWEYTGPLY	40
FtmPT1	-----MPPAPPDQKPCHQQLQA-----	PYRALSESILFGS--VDQERWWEHSTAPIL	44
CdpNPT	-----MDGEMTASPPDISACDTSADVDEQGGSGQSA-----	PIPKDIAYHTLTALKLLFPD--IDQYQWHHVAPML	65
CdpC3PT	-----MTVSS-----HAEVASAPCAEMG-----	HDIPYRTLSRSMIFAN--LDQYQWHQIGPVL	48
EAU38487 NCBI	-----MTKSIILAS-EPPSAESSG-----	RLPWKILGQTTGFPN--QDQELWWLNTAPLL	46
EAU38487	-----MTKSIILAS-EPPSAESSG-----	RLPWKILGQTTGFPN--QDQELWWLNTAPLL	46
AnaPT	-----MSPLSMQTDSDVCGTAENKSLTNGTND-----	QOLPWKVLGKSLGLPT--IDQYQWHLNTAPYF	58
SirD	-----MQTARLFQGNLNLAANIRDYEKKEQRN-----	LGVWLSLNQWLRLYD--EDTRFWWTTTAPML	57
7-DMATS	-----MSIGAEISLVPAPPGLNGTAAGYPAKTQKELNSGDFDAHDGLSLAQLTPYDVLTAALPLAPASSTGFWWRETPGVM		78
FgaPT1	-----MTKTDAGGRHPQETATHAATDEEVQDQWR-----	APFEVLSRLTLVFQH--EDHRLWWEAASKL	58
TdiB	-----	MATEYWSRHLSRLV	14
BrePT	SRFLEAG-QYGLHQOYQFMFFFMHHLIPALGPYPQ-----	KWRSTISRSGLPIEFSLNFQKGSN--RLLRIGF	113
CdpC2PT	SRLLLEAA-QYDVHDOYQYLLFMFGHIIPSLGPYPQ-----	RWKSMTTLGLPIEFSLNFQKGSN--ETVRVAL	121
CdpC7PT	SRLLQVA-RYDVHDOYATLLFLYKHLIPFMGPYPQ-----	RRRCVFEPYGAPEIYSINFQENKK--EILRIVL	127
FgaPT2	AKMLETA-NYTPCOYQYLLITKCEVIPSGLGYPTNSAP-----	RWLSILTRYGTFFELSLNCSN--SIVRYTF	103
MaPT	AEMLSQA-NYDAHAQYRHLAIYKKHVIPFLGVYPTNDRD-----	RWLSILTRYGTFFELSLNCSN--SIVRYTF	106
FtmPT2	LKLLRDA-KYQKQDQVPCYLLQQLLVYPGLTFFPVVQAP-----	LPWWSNVITYGVFELSNWLLH--NIVRIGF	108
FtmPT1	SRLLISS-NYDVHDOYKYLRLHLVLPALGPYPQRPDPETGIIA-----	QWRSGMVLTLGLPIEFSLNVAR--ALIRIGV	116
CdpNPT	AKMLVDG-KYSIHQOYQYLLCLFAQLVAPVLGPYPSPGRD-----	VYRCTLGGN-MTVELSNFORSN--STTRIAF	132
CdpC3PT	GKMLVDG-EYSIHQOYQYLLCLFAHLIIPKLGPFPSGRD-----	IYRCLLGNIGGPFELSNFORSN--STARLAF	116
EAU38487 NCBI	NEFLAEC-QYDVHDOYQYLLTFFRHHVIVPVLGPFAPGTTP-----	NFASRLSKHGHLDFSVNFQESG--ATVRMSL	115
EAU38487	NEFLAEC-QYDVHDOYQYLLTFFRHHVIVPVLGPFAPGTTP-----	NFASRLSKHGHLDFSVNFQESG--ATVRMSL	115
AnaPT	NNLLIQ-CYDVHDOYQYLLAFYHRRHVLVPLGPFIRSSAEA-----	NNISGFSAEYPMELSVNYQASK--ATVRLGC	127
SirD	GRMMELI-GYDQDAQKHLFYIIVLPSLGRRRSPGEGYPTG-----	WNSFMTDDYSPLSLSDWDG--VAEGSSSVRFSCI	129
7-DMATS	SKLLAKA-NYPLVTHYKYLMLVHTHILPPLGPRPPLNSTHPSPSNAPWRSFLLTDDFTPLPSPWNVNGNSEASTIRLGI		157
FgaPT1	ATYLRAL-KKSVGSQYQHLMLFYSVYAPNLGPWPNDRKDN-----	VHWVCICPGGLENLISMNYQGAQ--CTVRIAA	129
TdiB	APLFAAAGTSPEDQESHAFIDEHIAFNLGFLPWEPHG-----	PSTPSSILVGSFPDFPSINIVSSGK--AKVRDFD	84
BrePT	EPVNFSLGSSSQDPFNRIPIADLLAQLARLQLRGFDTCFQQLLTFQLSLDEVV--QLPPD-----	DOPLKSGAGFGFDE	186
CdpC2PT	EPVSVVSGTDEDPFNLITIRKFMSDIANLGLESFDMELHDVILINAFPPSANEIR--DLQASGYGKRGGEQKSPSAFGDL		199
CdpC7PT	DLVSVVPCIKDNPSHLDCVAAFEFTLQISSKVNRLDYKHFDADFLPKKDE--DLAQHEMIDSNFPAVALWGFVL		205
FgaPT2	EPINQHGCTDKDPFNTHAIWESLQHLPL-EKSIDLEWFRHFKHDLTLNSEES--AFLAHNDRLVGGTIRTONKLALDL		179
MaPT	EPINAAATGTEADPFNTHAIWESLQRLKAV-QPAISLDYFNHFKRDLTINSQEA--AYLHENN-LAEGQIWTQNKLALDL		181
FtmPT2	EPLSHLAEAGVDAFNKTAPEECVSRACL-DNITDLARFRHFQHLHLVTPTEE--TWLLKEKAPLAKSGRGQOTLAVEF		184
FtmPT1	DPVTADSGTAQDPFNTRPKVYLETAARL-LPGVDLTFRYEFETELVITKAE--AVLQANPDLFSPKWSQILTAMD		192
CdpNPT	EPVRYQASVGHDRFNRTSVNAFFSQQLQLL-VKSNVNIHLHLLSEHLTLAKDERNLNEEQTLKYLTFNFKVQYVVALDL		211
CdpC3PT	EPTSYLASADPFNRHVAHTLAELRMTGSATVDLELHHLAALDLTLDR-----	NEQLLTAEAKTNWKSQILLALDL	191
EAU38487 NCBI	GAGSFGAGLQDDPLNQFRAREVLDKLAIL-YPTVDLQLFKHFESEFGINHADA-----	LKVAAKLPKLDRATKMTAIDM	188
EAU38487	GAGSFGAGLQDDPLNQFRAREVLDKLAIL-YPTVDLQLFKHFESEFGINHADA-----	LKVAAKLPKLDRATKMTAIDM	188
AnaPT	EPVGEFAGTQDDPMNQFMIREVLGRSLRL-DPTDRLDFYFDSQFSLTSEA-----	NLAASKLIKQRQSKVIAFD-	199
SirD	EPIGKYAGTQADPLNQKMYQLVDGLRPAFHHTLILFLDFVSEALTTSREKFG-----	TRKLSLEG--RSQYFVAFDL	201
7-DMATS	EPIGFEAGAAADPFNQAAVTFMHSY-EATEVGATLTLFEHFRNDMFVGPETYA-----	ALRAKIPGEHTTQSLAFDL	231
FgaPT1	ETITPAAGTDKDPFNLTAEKMIEDLKAL-QPNLNTFTWNHNFQREVLVPEEVALN-----	NDEIISKVPFNQRLHGLDL	203
TdiB	DVISPDPRTGPDPAEGSAREILHRLADL--VGADTQWGMYLMDALYLTPEAE-----	VAKTKLPPGVATPPSSVGFDE	157
BrePT	NPDGAILVKGYVFPYLKAKAAGVPVATLIAESVRAIDAD--RNQFMHAFSLINDYMOESTG-----		245
CdpC2PT	KAGGCIIVKGYCHLLKHLATGTPVSDIVREPLVRLCR--QMTCSAAFDLMHDYLTSSG-----		257
CdpC7PT	EEGGDVNIKGYINPRPNKAVGASPRERLNEISLQKLD--MVDYSDSLKLVREYIMEGSW-----		263
FgaPT2	K-DGRFALKYIYPALKAVVTGKTIHELVSFVSRRLAVR--EPRILPPLNMLEEYIRSG-----		236
MaPT	K-GGEFVMKAYIYPALKAIATGKSIQELMFSSVRDLTKG--QANISSSLGMLDYLECRG-----		238
FtmPT2	Q-NGGISAKAYFFPGMKSLATGLSPGKLILDSIERLALPGLKEPVHHLRSTGLQDDGHP-----		243
FtmPT1	QKSGTIVLVKAYFFPGPKSAVTGRSTEDLLVNAIKRVDR--GRFETQLANLQRYIERRRRGLHVPGVTTADKPPATAADK		269
CdpNPT	R-KTGIVAKYFFPGIKCAATGQTSNACFGAIRAVDK-----	GHLDLSLCQIEAHFQ	264
CdpC3PT	N-KTGIVLVKAYFFYPAKAAATGHSVAELCFSAIRKVDVQ-----	GRLAAPCKAIEAHMQR	245
EAU38487 NCBI	LKNGSMIFKVVYVMVRSKAAATGLPVHTVLFNAVQRLG-SAFEPGLSLLKQFLSPLCDAG-----		246
EAU38487	LKNGSMIFKVVYVMVRSKAAATGLPVHTVLFNAVQRLG-SAFEPGLSLLKQFLSPLCDAG-----		246
AnaPT	LKDGAIIPKAYFFLKGKSLASGIPVQDVAFNAIESAPKQIESPLRVLTFTVTKLESKETV-----		260
SirD	D-VGHFRLKAYFFPGLKSLIESNTPVSELVVKAMDACELHFGSLFMQAFRRRLSDLEAFSAT-----		261
7-DMATS	D-AGRVTKAYFFPILMSLKTQSSTKVVSDBILHLALKSEVWGVQTIAMS-VMEAWIGS-----		290
FgaPT1	S-EGAFMLKSYFMPAIRSAITGVENTQIMFESIRKLNKN--ANFISALSLEDWMVPTNG-----		261
TdiB	D-GPERLKLKFIYPSVRKALATGQVSELMMLKTLRGLQPLG--SELVPAMDLIASVLSRTN-----		215



BrePT	-----YNEYTFLSCDLVEM---SRQRVKIYGAHTE-VTWAKIAEMWTLGGRLEIEPEIMEGLARLKQIWSLLQIG---E	312
CdpC2PT	-----YKHTTFLSWDYVPK---EKSRLKVYSGSTS-ISLKEAEVWSLGGRRVOGE-EISEGKLIKQLWKLGLKSCSTPN	327
CdpC7PT	-----HTGDQLVSWDYGP---EVSRIKIYGVAPENYSPTIRDVWTLGGRRVNTS-TSRKGLELAIKLWEFLHMR---M	330
FgaPT2	---SKSTASPRLLSCDLTSP---AKSRIKIY-LLEQMVSLSEAMEDLWTLGGRRR-DASTLEGLSLVRLWDLIQLSPGLKS	309
MaPT	---PESTACPRLLSCDLISS---HKSRIKIY-ISEDVVSFPAMODLWTLGGRRR-DDSTLAGLELIQELWDLIQLPPGLRS	311
FtmPT2	---TDATAPFLLGVDLCTP---ERSRLKFY-VTDQVVSWDVADWMTLRGRKLEDPCADGLALLRKLWDLIQLPPGLRS	317
FtmPT1	AFDACSFFPHFLSVDLVEP---GKSRLKFY-ASERHVNLMQVEDIWTGGLRR-DEDALRGLELLRHFWADIQMREGYYT	344
CdpNPT	---QSKIDDAFLCCDLVDP---AHTRFKVV-IADPLVTLARAEHWTGGLRT-DEDAVGLIIRGLWSELGIQIG-PL	335
CdpC3PT	---QQTDDIHFLEVDLVEP---GTRFRKLY-LMELEVTLAKLEEHWTLGGTLT-DKEMRMGLQMIRELWVDLEIVDGKRA	317
EAU38487 NCBI	-----ETDLGLLSFDCVPT---ESSRIKLY-AIKQVGSGLDAIRNLWTLGGTMD-DPTMKGAVLEHVCELLQFG---W	312
EAU38487	-----ETDLGLLSFDCVPT---ESSRIKLY-AIKQVGSGLDAIRNLWTLGGTMD-DPTMKGAVLEHVCELLQFG---W	312
AnaPT	-----TSDVFILAVDCIVP---EKSRIKLY-VADSQLSLATLREFWTLGGSVT-DSATMKGLEIAEELWRILOVDDAVCS	330
SirD	---SYHRPEIEIVGIDCVSP---VKSRAKIY-IRHRGTSFDSVCRMLSMG-AKAPLD--AASVAISRLRLWALVGLPKDFE	332
7-DMATS	---YGGAAKTEMISVDCVNE---ADSRKIY-VRMPTSLRKVKAYCLG-GRITDENKEGLKLLDELWRLVFGIDD---	360
FgaPT1	---RFMEYWDGISYDAVDA---CKARIKIY-TGIRMSIEHARDVWTLGGRLLQ-GEDIEKGFDLVARLWRLMDEEPSTC	333
TdiB	-----DAMLPLVGIDCLDPRTHKNARVKCY-LHTSSNSFAVVRDVLTLGGRLS-DDTSLKRVENLKSVPPLLINELEGPC	288
BrePT	GSRAFKGGFDYCKASATDQIPSPITWNYEIS-PGSSFFVPKFFLVP---HGENDLRVARSLAQFWDLSLGSW---EHACAYPD	387
CdpC2PT	TAQPVLEFQVNV-EAQOKFPPLTWNLYEQ-PGISHPLTKLYFPV---HGMNDLKVAEALSKFFHFLGWH---DQAESYLS	401
CdpC7PT	ESPMD-----RKREFLMHGMLWHYEVW-PGAQVVPKLYLPA---AGTNDGRVAETISKFFYSLGWK---EASYSYPO	397
FgaPT2	YPAPYLPGLGVP---DE--RLPLMANFTLH-QNDPVPPEQVYFTT---FGMNDMAVADALTFFERRGWS---EMARTYET	378
MaPT	YPEGYLPGLGARP---TE--LLPSMANFTLH-PDHPVPEQVYFTT---FGMNDMAVADALTFFERRGWT---DMAREYKR	380
FtmPT2	NIRPDFAFGTTP---PEDYRPVMMANWTLH-PKKKFPDQIYLLT---VGMNDMAVMDALVAFYEVLGWT---DLASTYKD	388
FtmPT1	MPRGDFAFGKSS---AG-FEAPMMFHFHLDGQSQSPFPDQMYVCV---FGMNSRKLVEGLTFFRRVGVWE---EMASHYQA	415
CdpNPT	EPSSAMMEKG-----LLPIMLNEMK-AQSRLPKPKLYMPL---IGIPETKIARIMTAFTRHDMP---EQAEVFME	399
CdpC3PT	EPQRPSPISGD-----PLSIVPFFMNYEIT-PGQPLPKPKFYFPL---IGIPELKIANVLAFFERHGMH---DLARVYPE	385
EAU38487 NCBI	SGDSR-----VQPILFNFEIK-KG-SPPKPKQIYIPL---ADRYEFDAAKLKAVFQDLWKRVPFYQDTGK	373
EAU38487	SGDSR-----VQPILFNFEIK-KG-SPPKPKQIYIPL---ADRYEFDAAKLKAVFQDLWKRVPFYQDTGK	373
AnaPT	HSNMD-----QLPLVNVNYS-SGSAFPPKQLYLPL---HGRNDEAMANALTKFWDYLGWK---GLAAQYVK	390
SirD	SDQELPSVPHR-----TSGLVLYFEIK-PTSDAIVPKVYIPVRHYASNDLSIAQGLATYFERRGQT---VAAENVVD	400
7-DMATS	EDAEFLPQNSHR-----TAGTIFNFELR-PGKWFPEPKVYLPVRHYCESDMQIASRLQTFRRGLGWH---NMEKDYCK	428
FgaPT1	EMKYW-----MQVWELR-TDVPPFPKLYFSV---AAEDHYVSDTVVEILDYLGWD---DLVQTHRA	390
TdiB	SDAAMDESWSKPERLNRTGYSGIOYTIET-PEQAIPDTKIYVPLFO-TDSSEVAERNFESALKKLGNEW-GLSGKYRS	366
BrePT	MLQQLYPLDLVSRISRLQSWISYSYAKKGVMSVYFHSQSTYLWEED-----	435
CdpC2PT	VLRDL-----	406
CdpC7PT	MLKDIFFPDVLSQSSRLQTWISFSYTEQGGAYSTVYVQAATRSTEFLEA-----	446
FgaPT2	TLKSYYPHADHDKLNYLHAYISFSYRDRT-PYLSVYLQSFETGDWAVANLSKVKCDAACTALPPDLSTGVVYSG	457
MaPT	SLKAYYPDENYETMNYVHAYISFSYRKNN-PYLGVYLQSFETGSWSTGELS-----YIRS	434
FtmPT2	KVASYPGPDFTKINYHSGVSFSYRHSK-PYLSVYYSPE-----	427
FtmPT1	NFLANYDEDFEKAHLCAVVSFAKNGG-AYVTLNHSFNVPVGDVSFPN-----	464
CdpNPT	NLQAYYEGKNLEEAIRYQAWLSFAYTEKKGPPYLSIYFWPE-----	440
CdpC3PT	NLQSYYPGEDLAIAIDRQAWLSISYTEKGPYLYMYH-----	423
EAU38487 NCBI	DLASVL-----	379
EAU38487	DLASVFPVPLGSLTNVHRWLSFSYTEARGPYMSVYVDVHPECGPSLDIVRFEPLKKSIE	434
AnaPT	DLYANNPCRNLAETTVQRWVAFSYTESGGAYLAVYFHAVGGMKGNL-----	437
SirD	ALSDIFSHRSLDSGLGLHTYISCTFKKT-GLSVYSYNPEIYHPNRYRQ-----	448
7-DMATS	HLEDLFPHPLSSSTGHTFLSFSYKKQKGVYMTMYNLVYST-----	472
FgaPT1	LMDEAWSLGCTKSYLAFSYISVTFSIKGPYITTYGNPSGPRPVE-----	436
TdiB	VMQEIFKDVN---YQOTYASFSYTEGKGVYTTSYVAMPKIDEGGSLAGDFGRN-----	419
BrePT	--	435
CdpC2PT	--	406
CdpC7PT	--	446
FgaPT2	LE	459
MaPT	F	435
FtmPT2	--	427
FtmPT1	--	464
CdpNPT	--	440
CdpC3PT	--	423
EAU38487 NCBI	--	379
EAU38487	--	434
AnaPT	--	437
SirD	--	448
7-DMATS	--	472
FgaPT1	--	436
TdiB	--	419

**Abb. 7-1: Multi-Proteinsequenzvergleiche von 12 ausgewählten Prenyltransferasen mit den vorhergesagten Sequenzen von EAU38487 zur Exonvorhersage.** Abkürzungen: EAU38487, vorhergesagte Proteinsequenz bestehend aus 1 Exon; EAU38487\_NCBI, vorhergesagte Proteinsequenz bestehend aus 2 Exons. FgaPT1 (Accession Nr.: XP\_756136), FgaPT2 (AAX08549), 7-DMATS (ABS89001), FtmPT1 (AAX56314), FtmPT2 (EU622826) und CdpNPT (ABR14712) sind aus *A. fumigatus*; CdpC7PT aus *A. terreus* (XM\_0013396.1); BrePT aus *A. versicolor* (JQ013953.1); AnaPT (EAW16181), CdpC2PT (KF220294) und CdpC3PT (DS027696) sind aus *N. fischeri*; TdiB (ABU51603) aus *A. nidulans*; MaPT (EU4200091) ist aus *Malbranchea aurantiaca* (*M. aurantiaca*) und SirD (AAS92554) aus *L. maculans*.

## 7.2 NMR-, MS-, H-H-COSY-, HSQC und HMBC-Spektren der isolierten Substanzen aus den CdpC7PT-Reaktionen

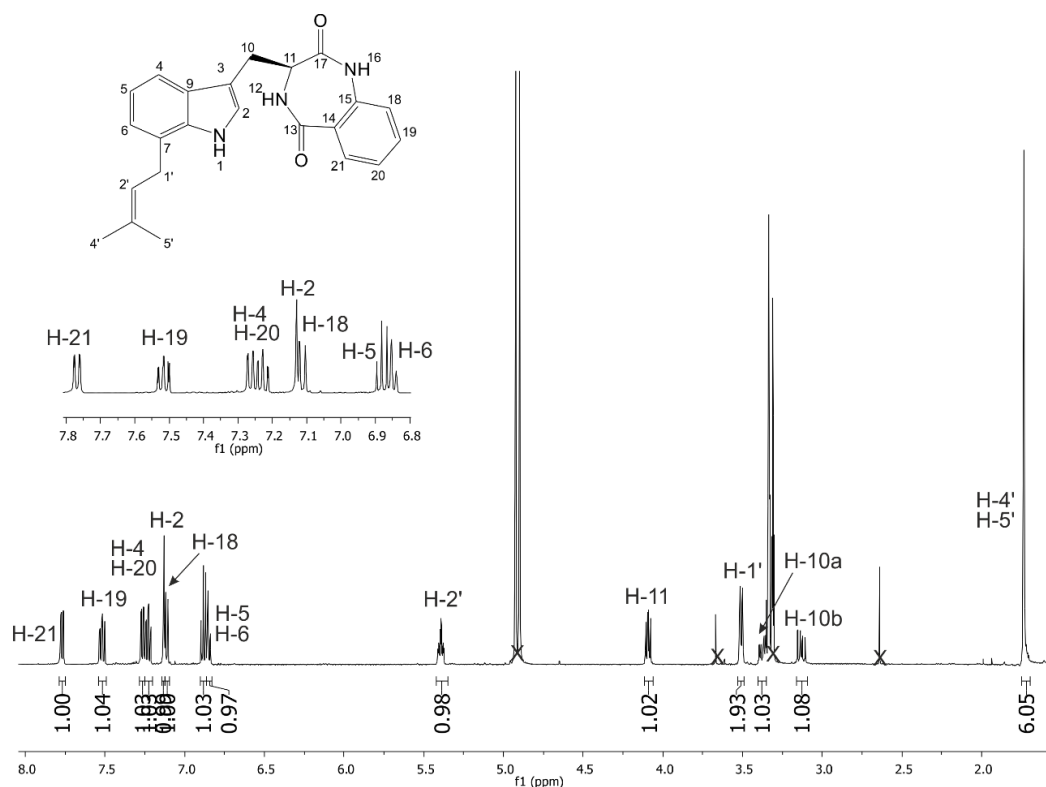


Abb. 7-2:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

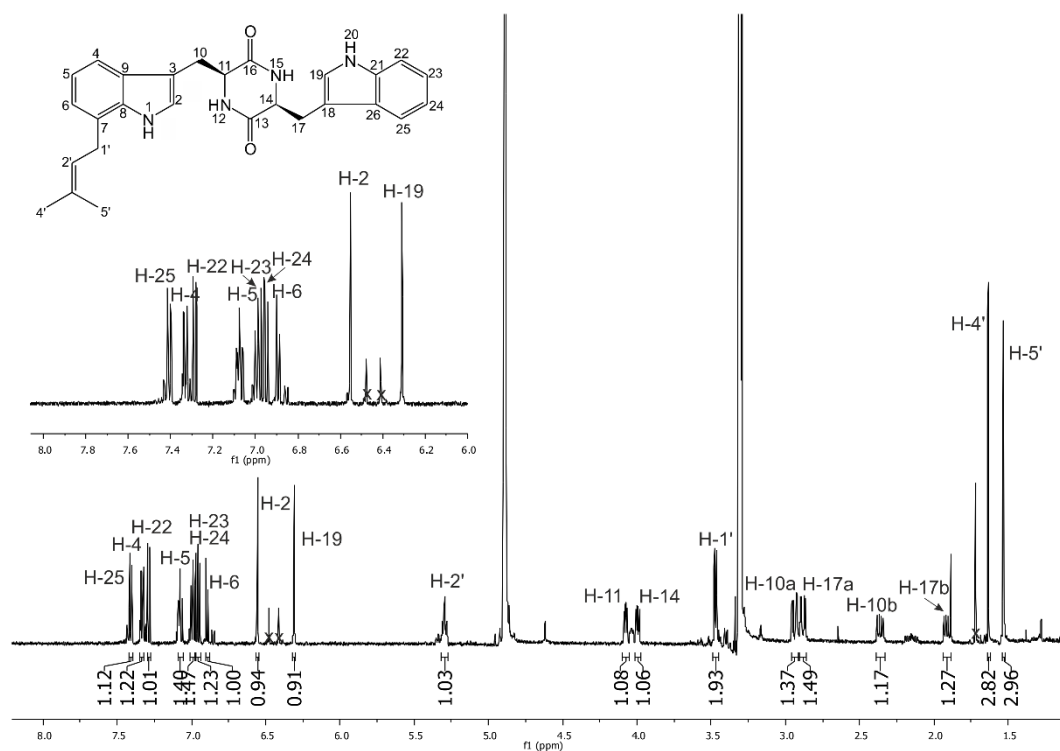


Abb. 7-3:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit CdpC7PT (3b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

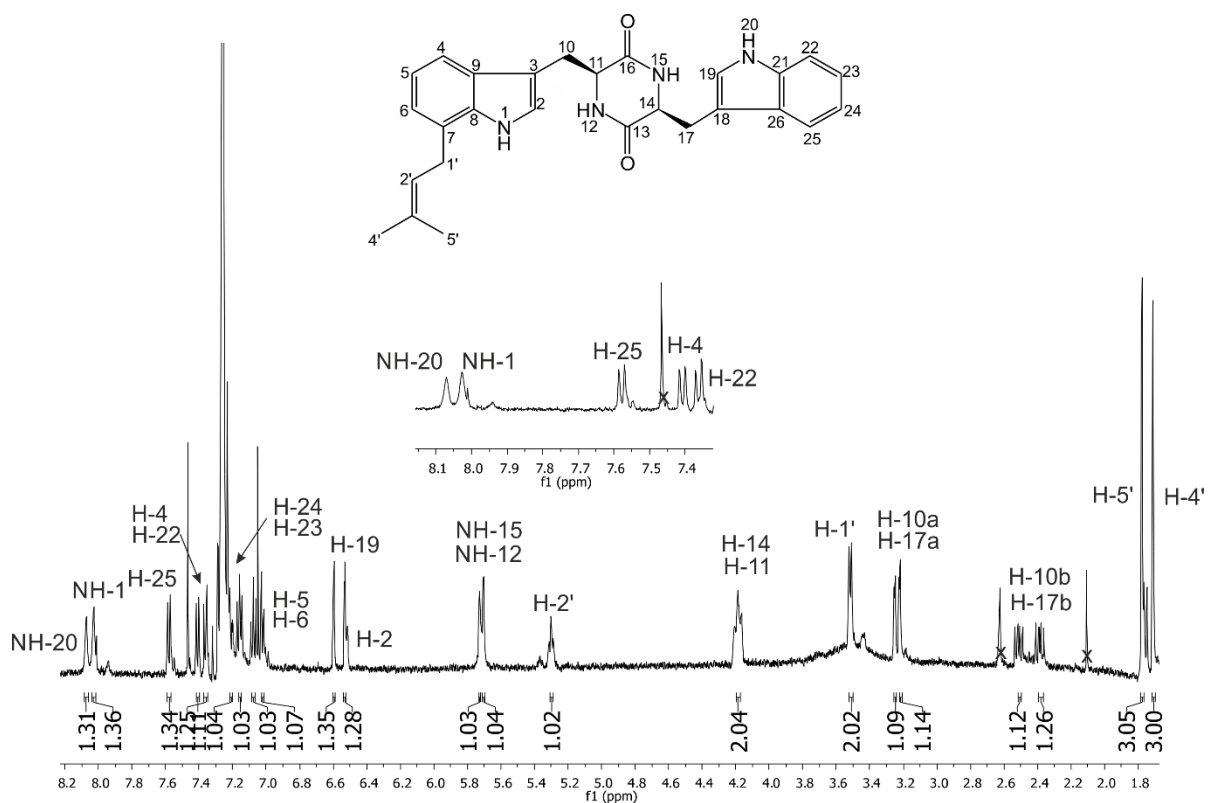


Abb. 7-4:  $^1\text{H-NMR}$ -Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit CdpC7PT (3b) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

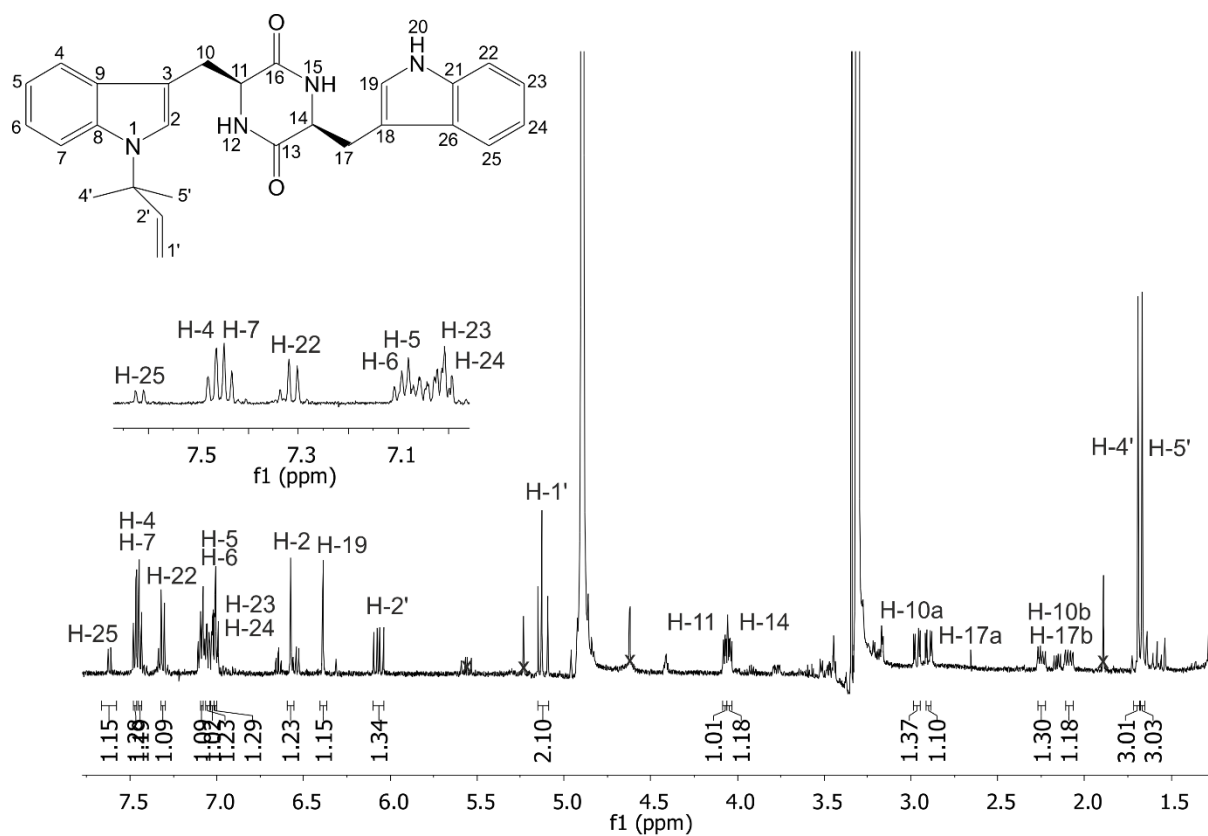


Abb. 7-5:  $^1\text{H-NMR}$ -Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit CdpC7PT (3c) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

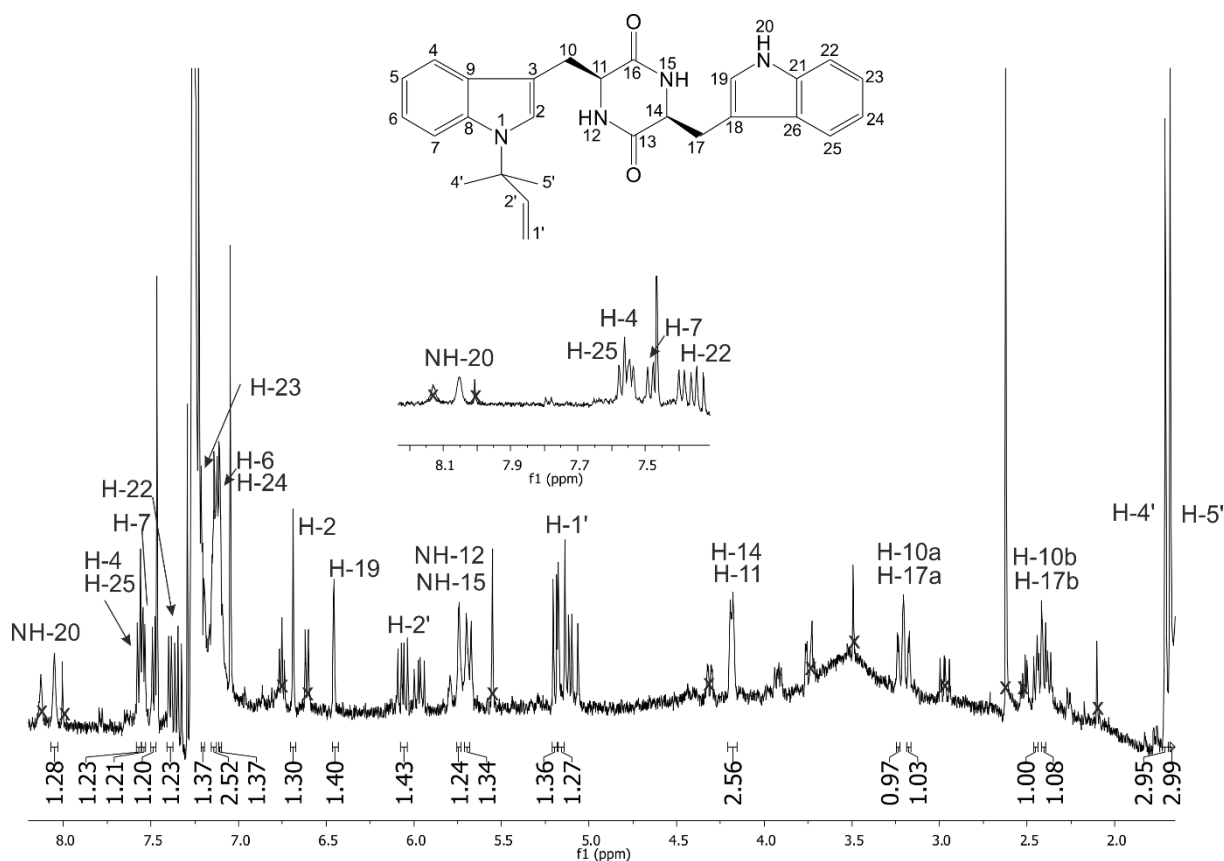


Abb. 7-6:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit CdpC7PT (3c) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

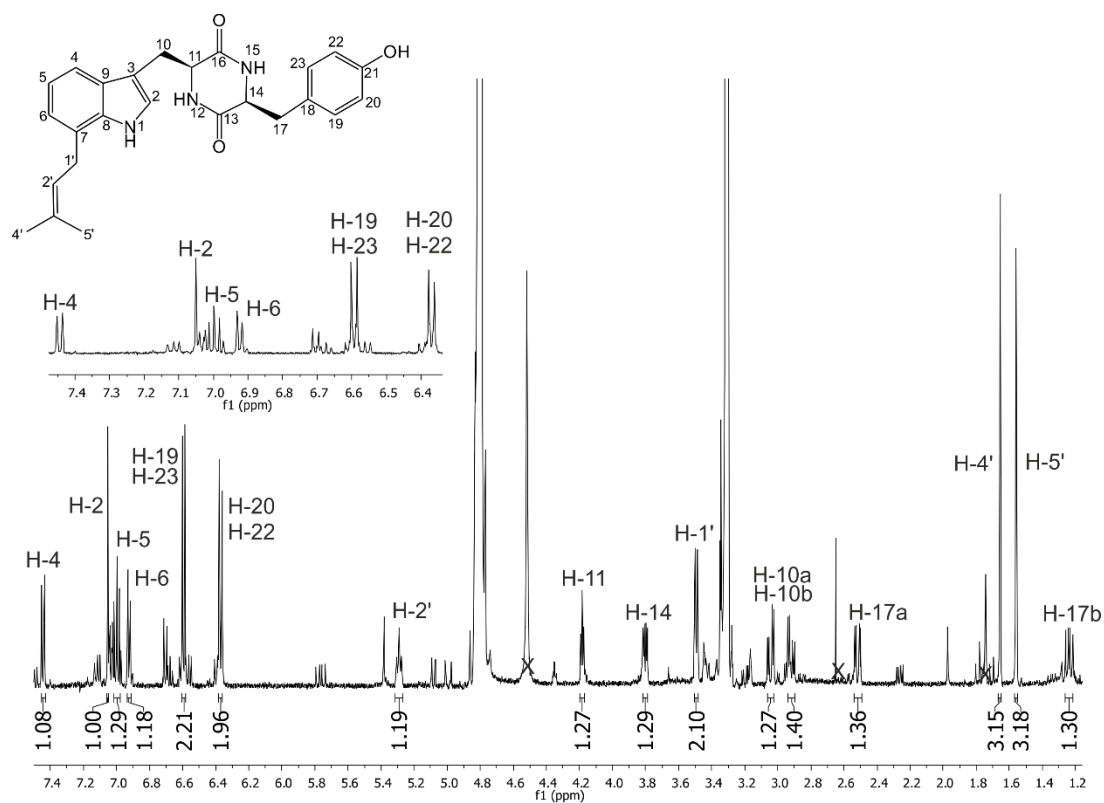


Abb. 7-7:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit CdpC7PT (4b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

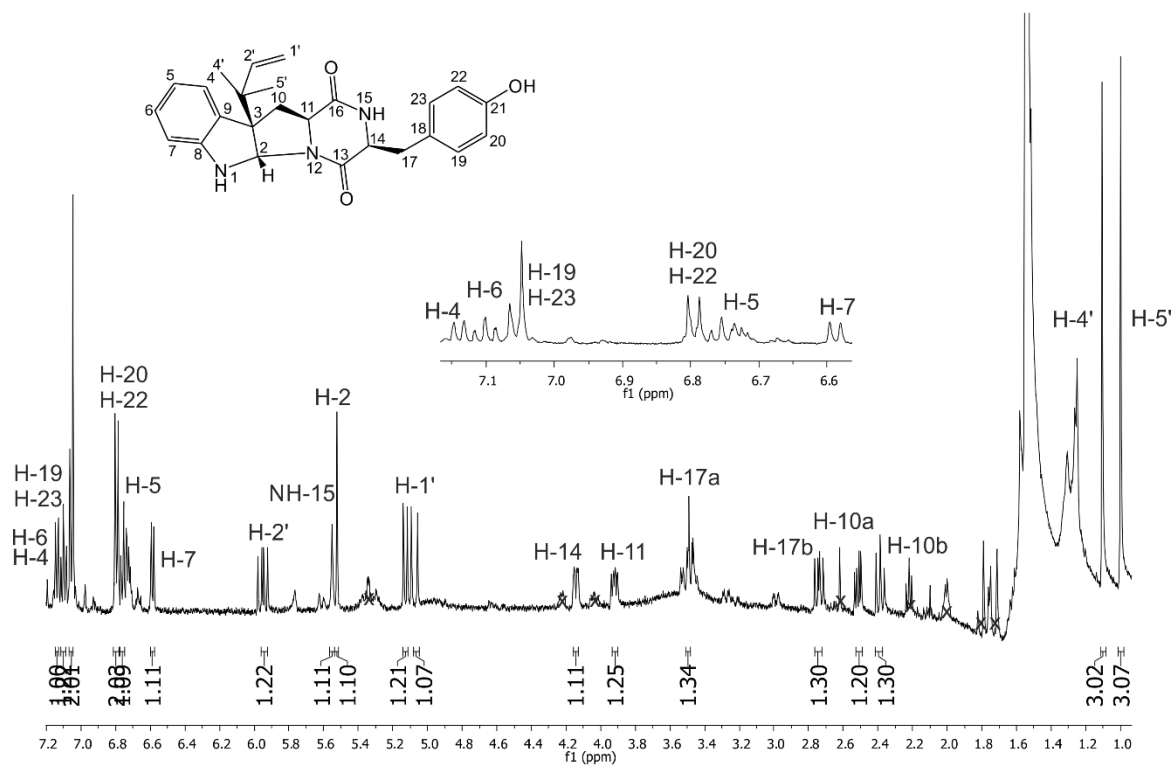


Abb. 7-8:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit CdpC7PT (4c) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

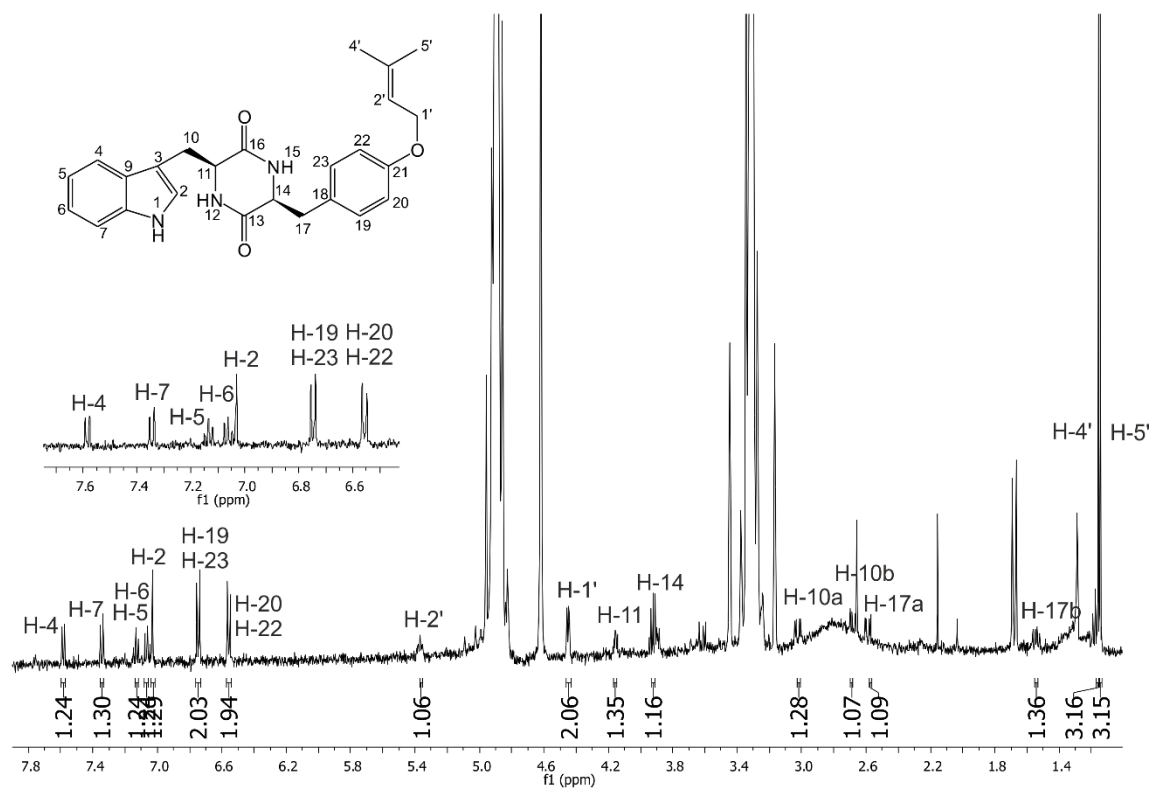
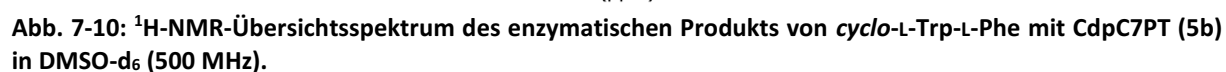


Abb. 7-9:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit CdpC7PT (4d) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).





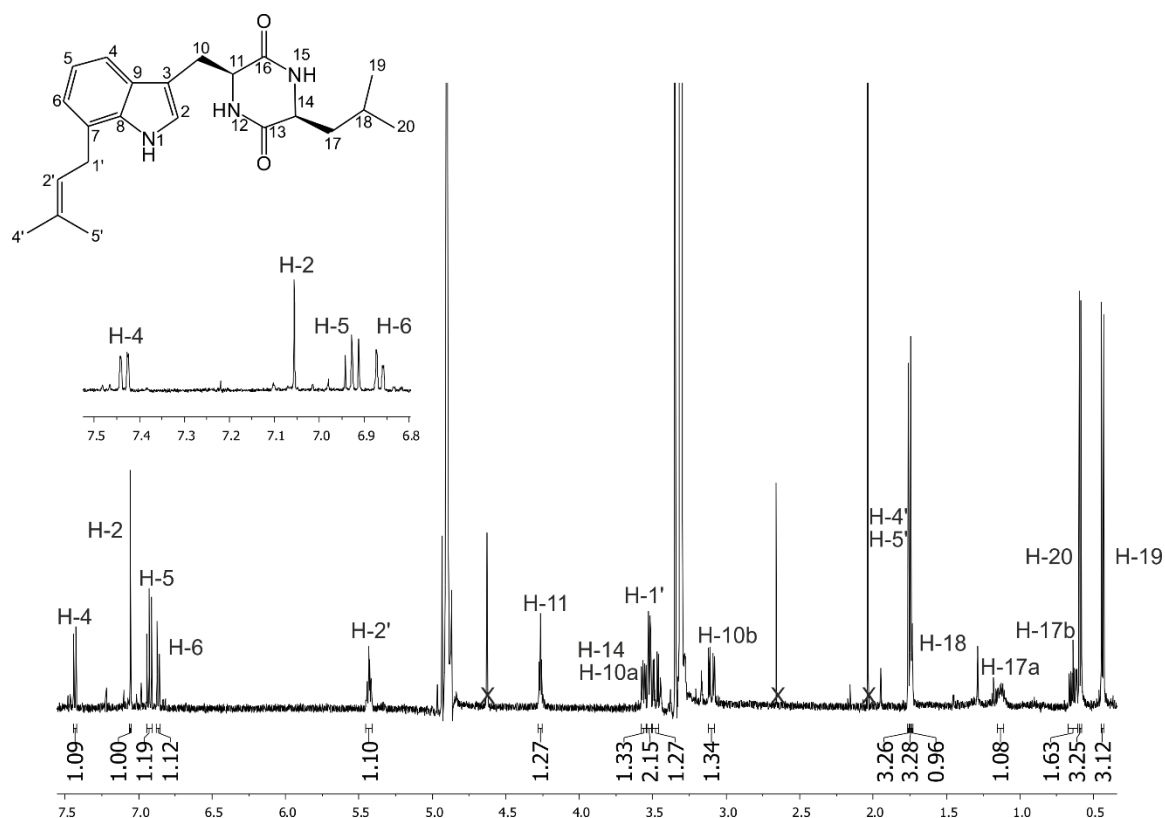


Abb. 7-12:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Leu mit CdpC7PT (6b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

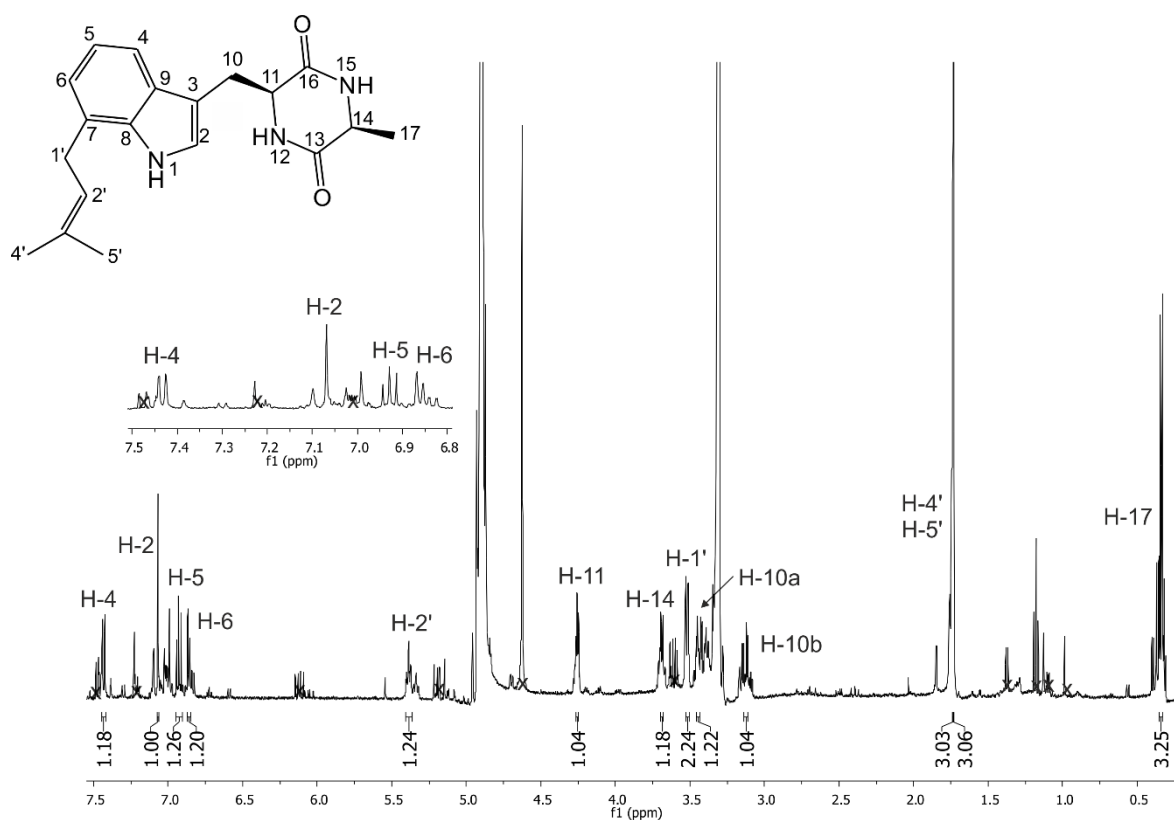


Abb. 7-13:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Ala mit CdpC7PT (7b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).



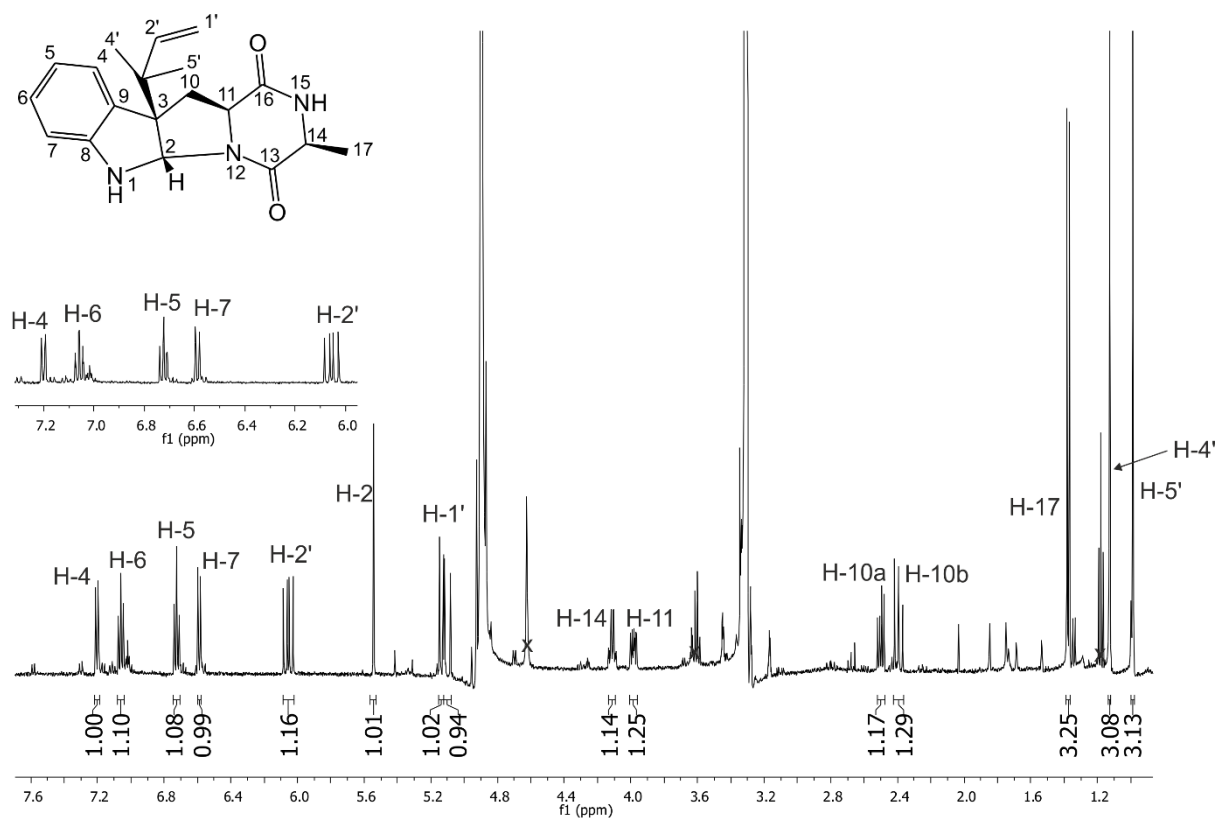


Abb. 7-14:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Trp-L-Ala mit CdpC7PT (7c) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

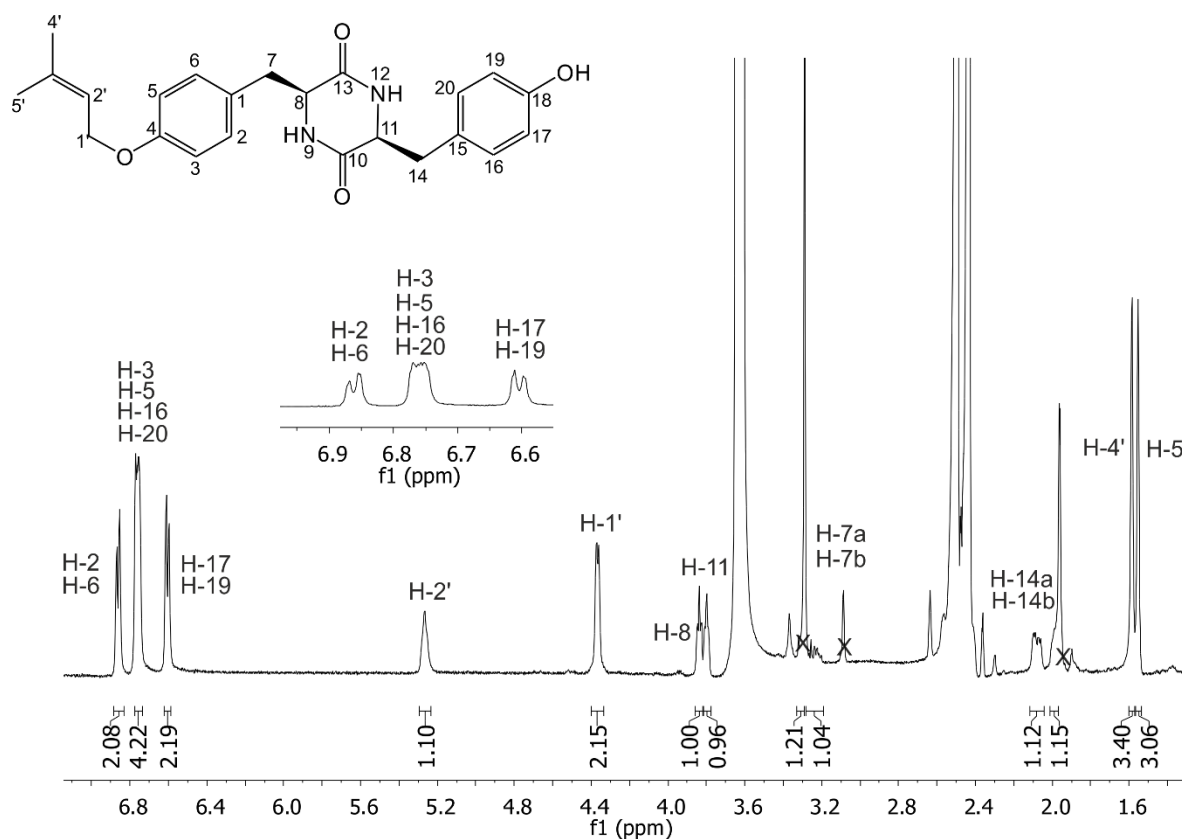


Abb. 7-15:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr mit CdpC7PT (18b) in  $\text{DMSO}-d_6$  (500 MHz).

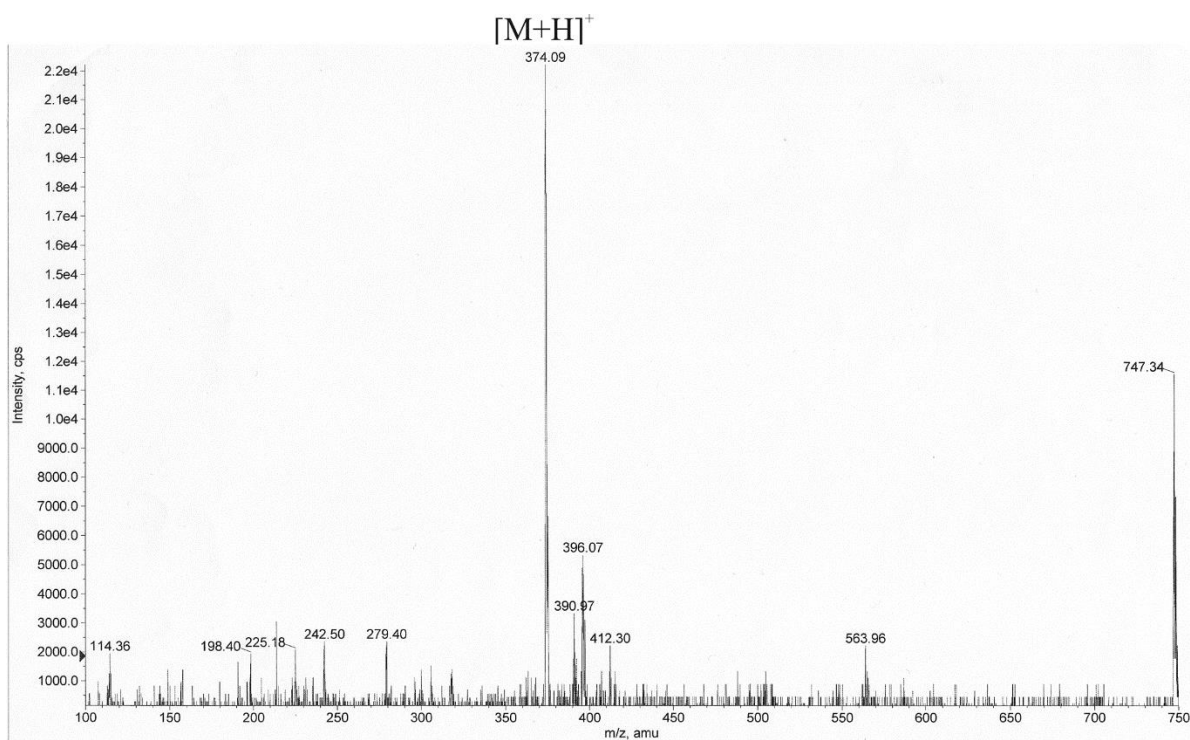


Abb. 7-16: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von (S)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 374,19.

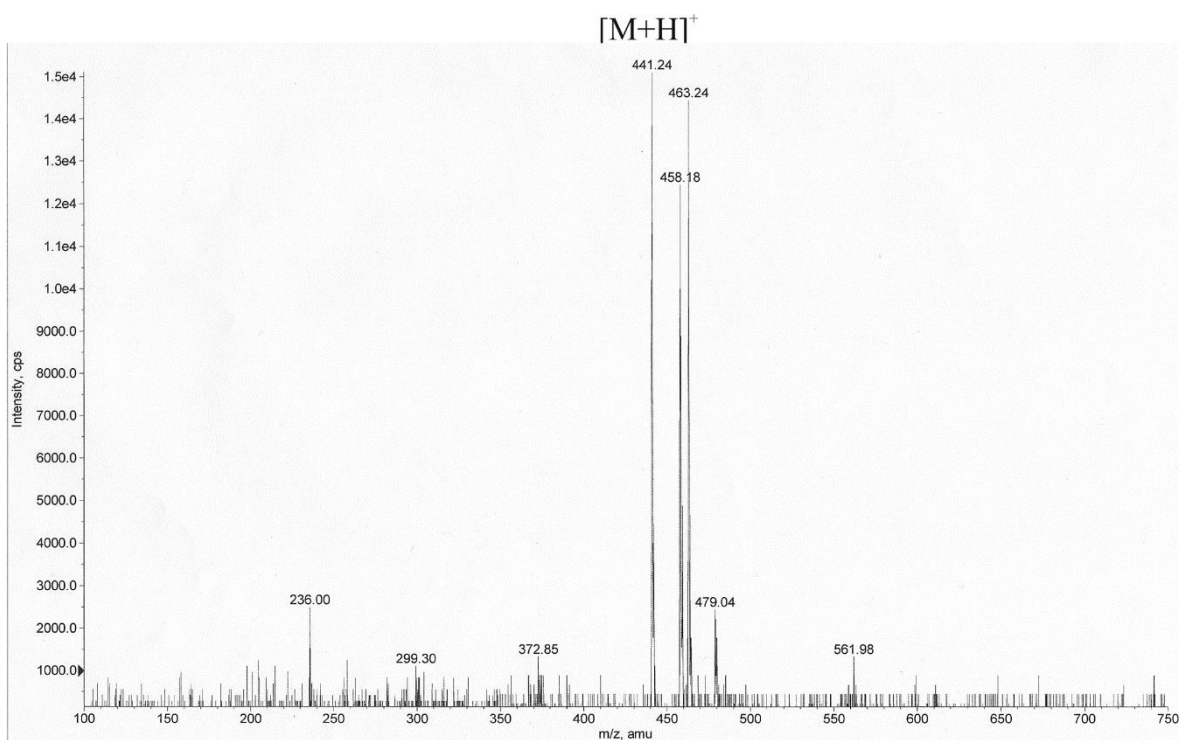


Abb. 7-17: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit CdpC7PT (3b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 441,22.

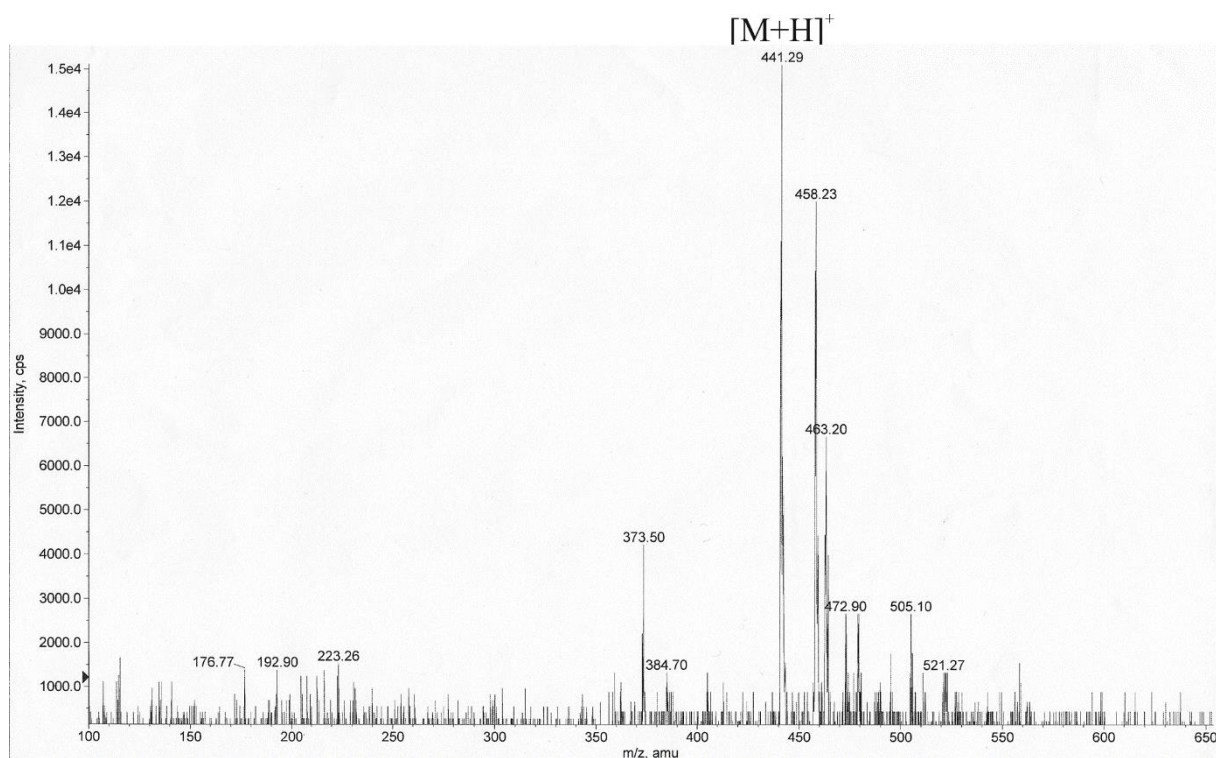


Abb. 7-18: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit CdpC7PT (3c), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 441,22.

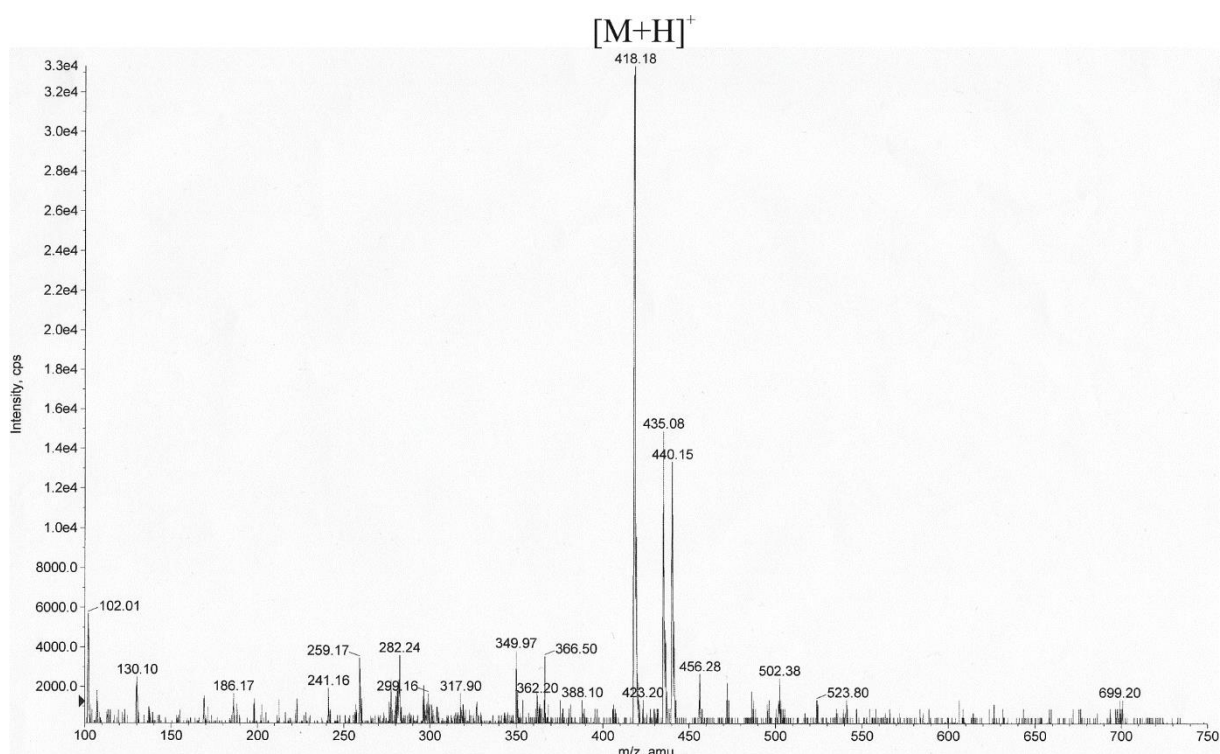


Abb. 7-19: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit CdpC7PT (4b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 418,21.



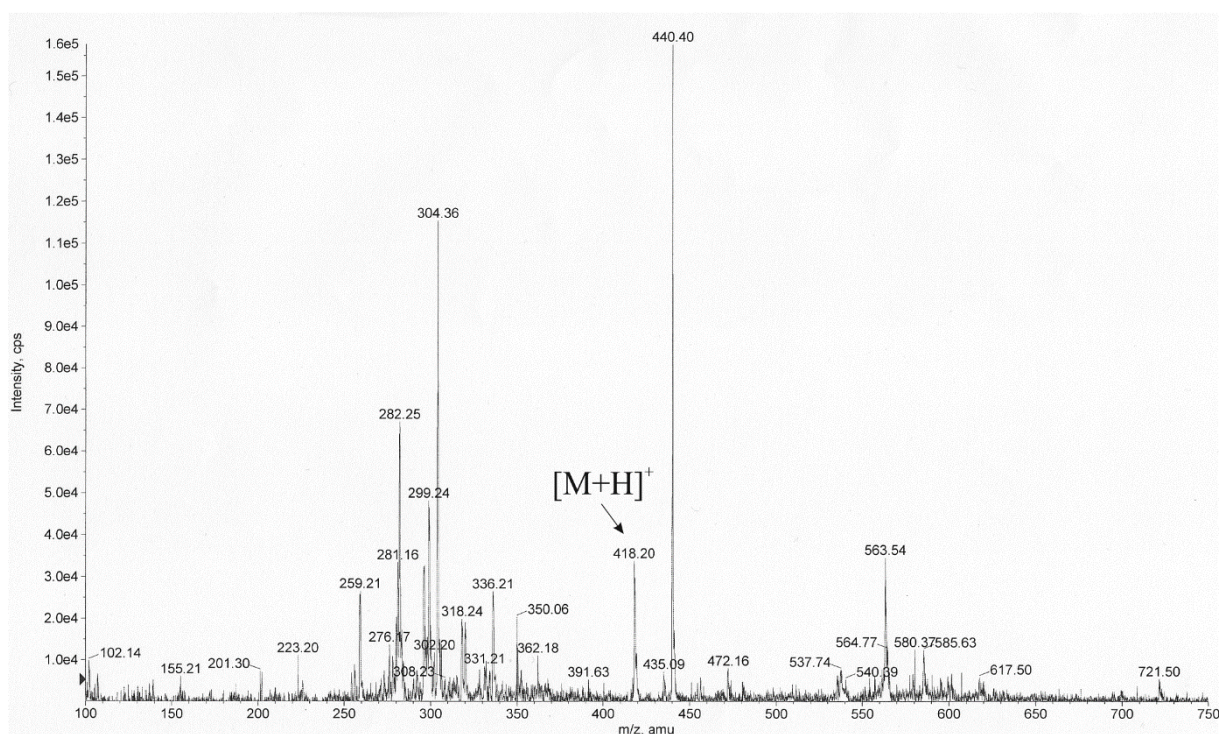


Abb. 7-20: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit CdpC7PT (4c), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 418,21.

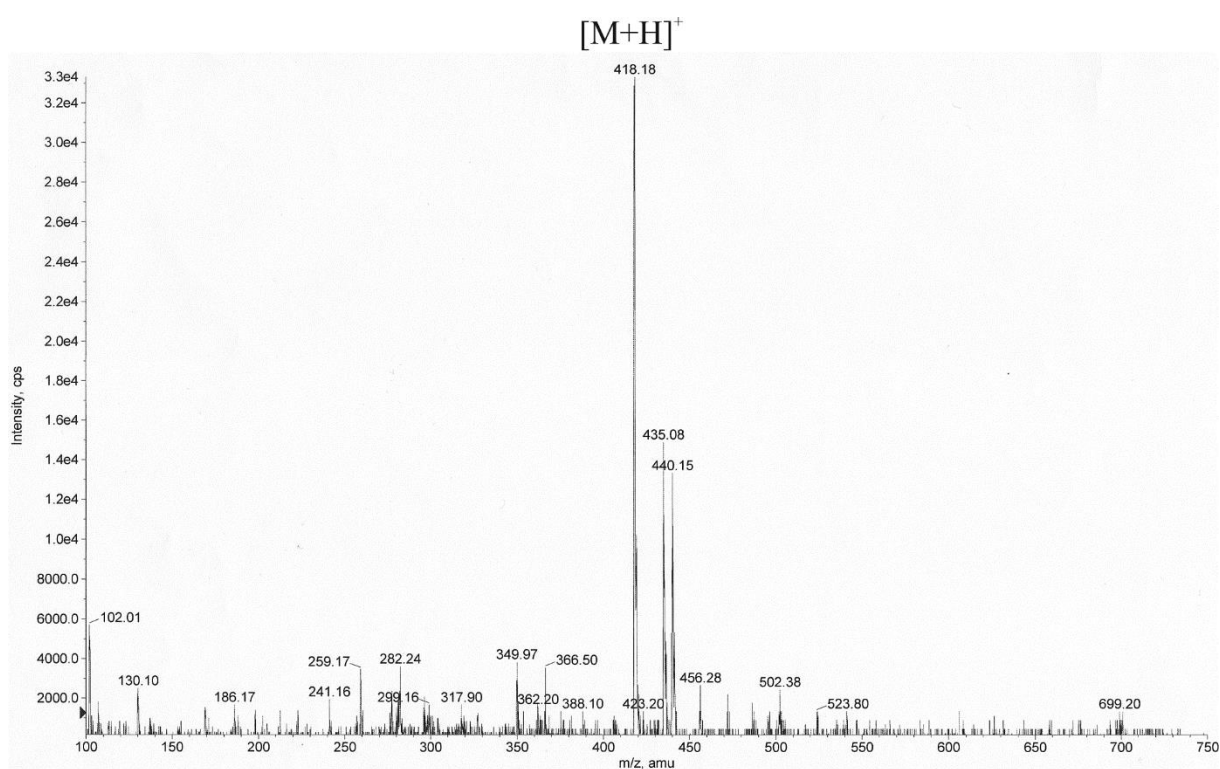


Abb. 7-21: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit CdpC7PT (4d), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 418,21.

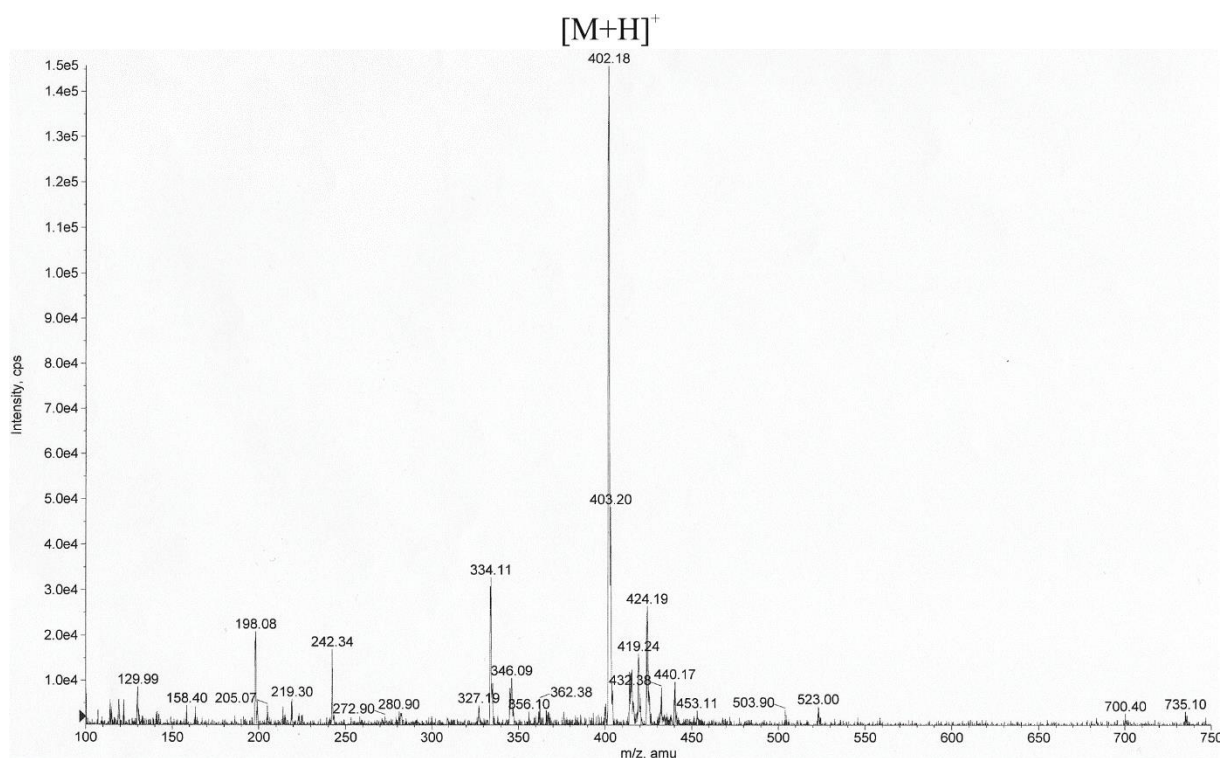


Abb. 7-22: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Phe mit CdpC7PT (5b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 402,22.

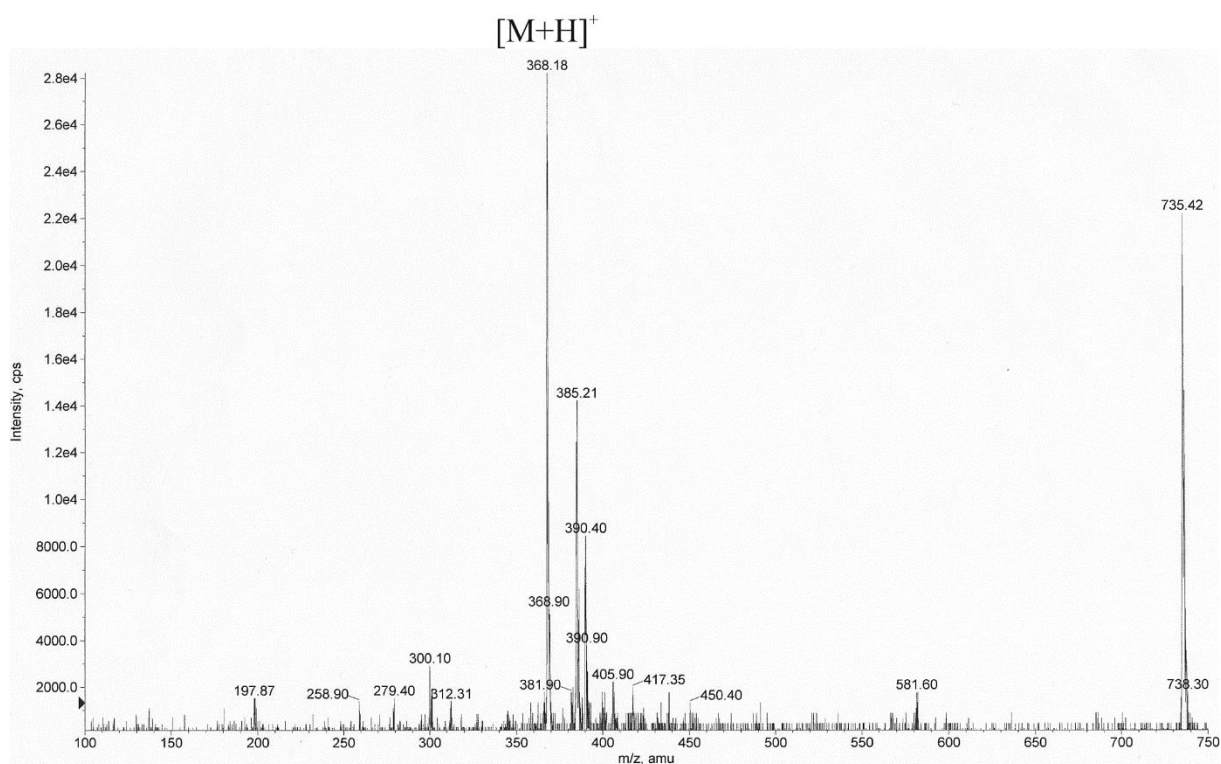


Abb. 7-23: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Leu mit CdpC7PT (6b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 368,25.



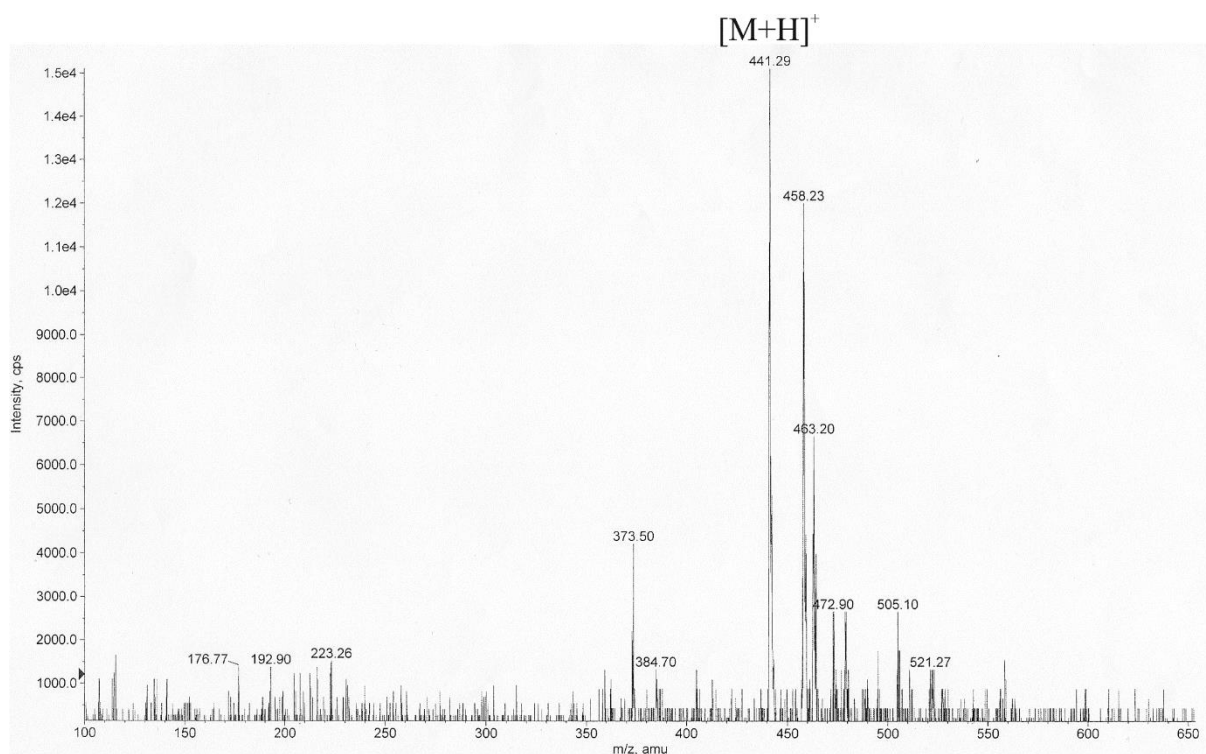


Abb. 7-24: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Ala mit CdpC7PT (7b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 326,19.

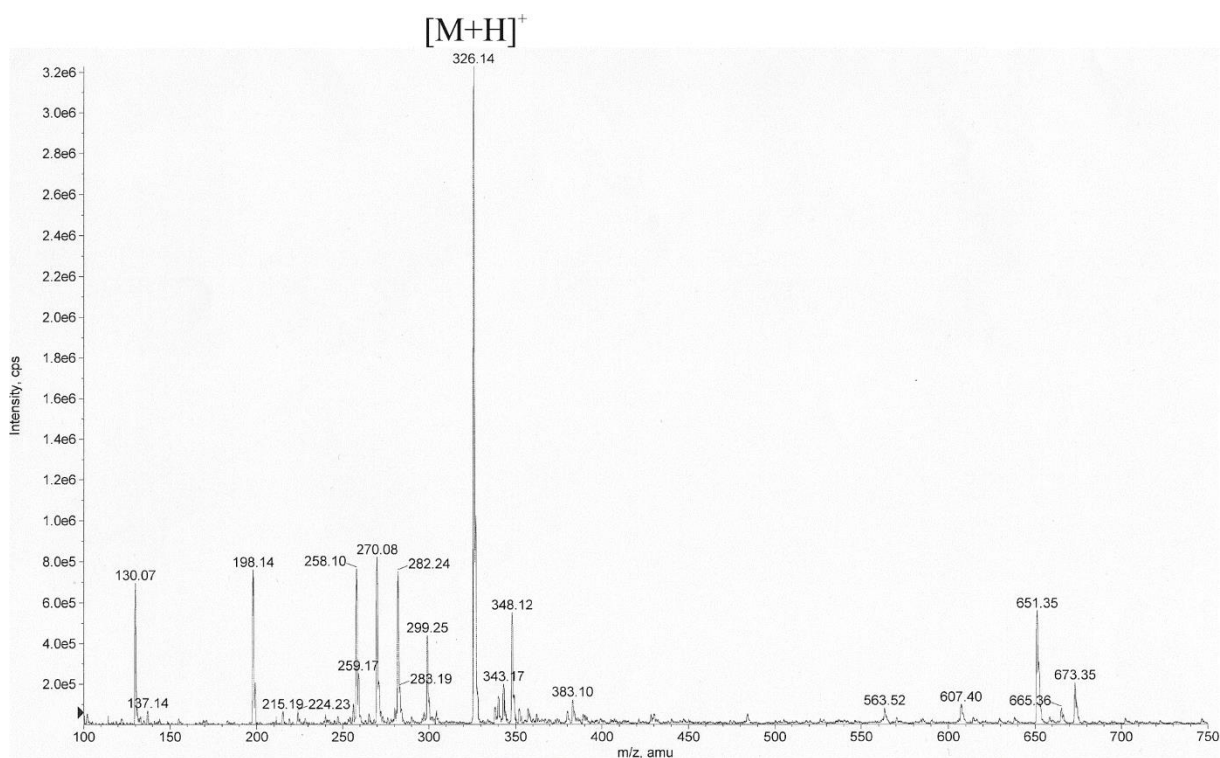


Abb. 7-25: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Trp-L-Ala mit CdpC7PT (7c), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 326,19.

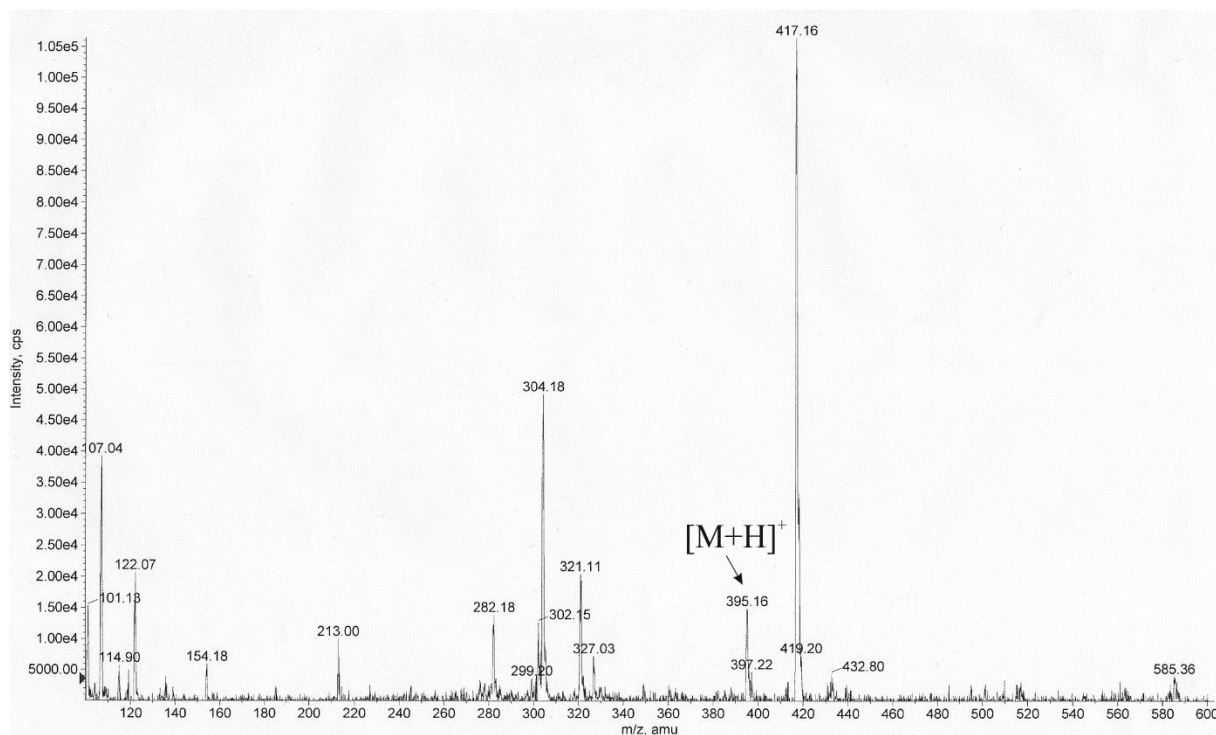


Abb. 7-26: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes von *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr mit CdpC7PT (18b), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 395,20.

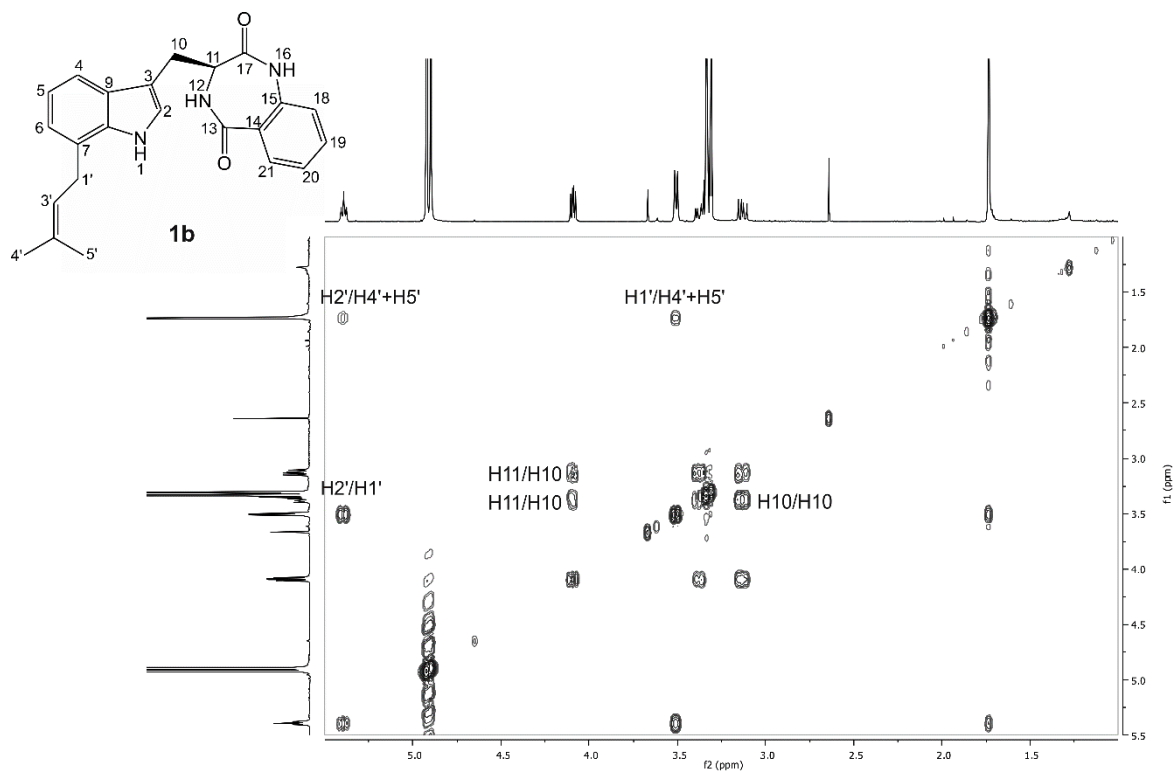


Abb. 7-27: H-H-COSY-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produktes von (S)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b) in  $CD_3OD$  (500 MHz,  $\delta_H$ : 1,0 - 6,0 ppm und 1,0 - 5,5 ppm).

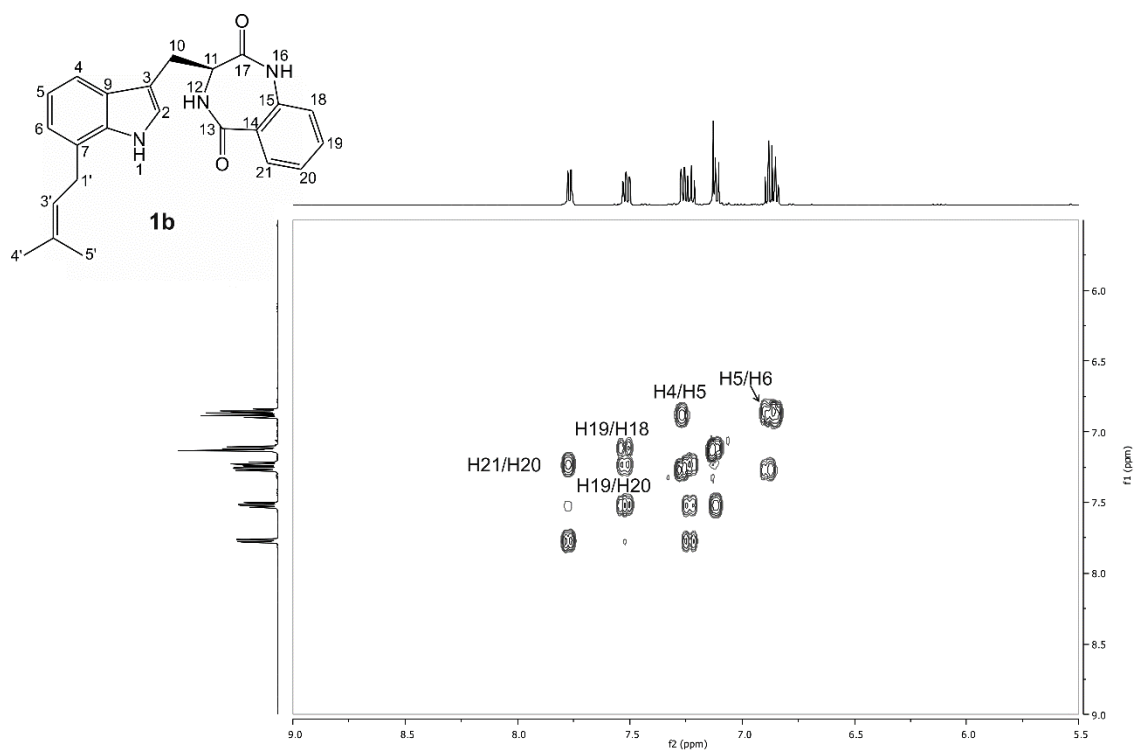


Abb. 7-28: H-H-COSY-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (**1b**) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 5,5 - 9,0 ppm und 5,5 - 9,0 ppm).

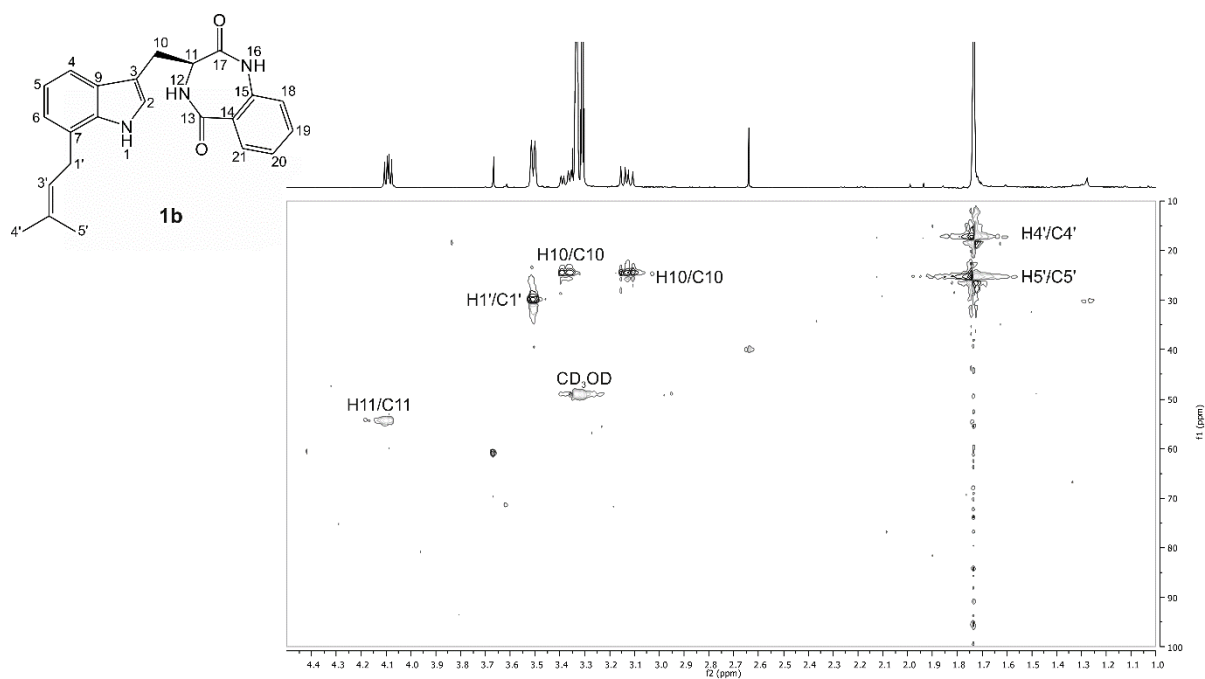


Abb. 7-29: HSQC-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (**1b**) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 1,0 - 4,5 ppm;  $\delta_C$ : 10 - 100 ppm).



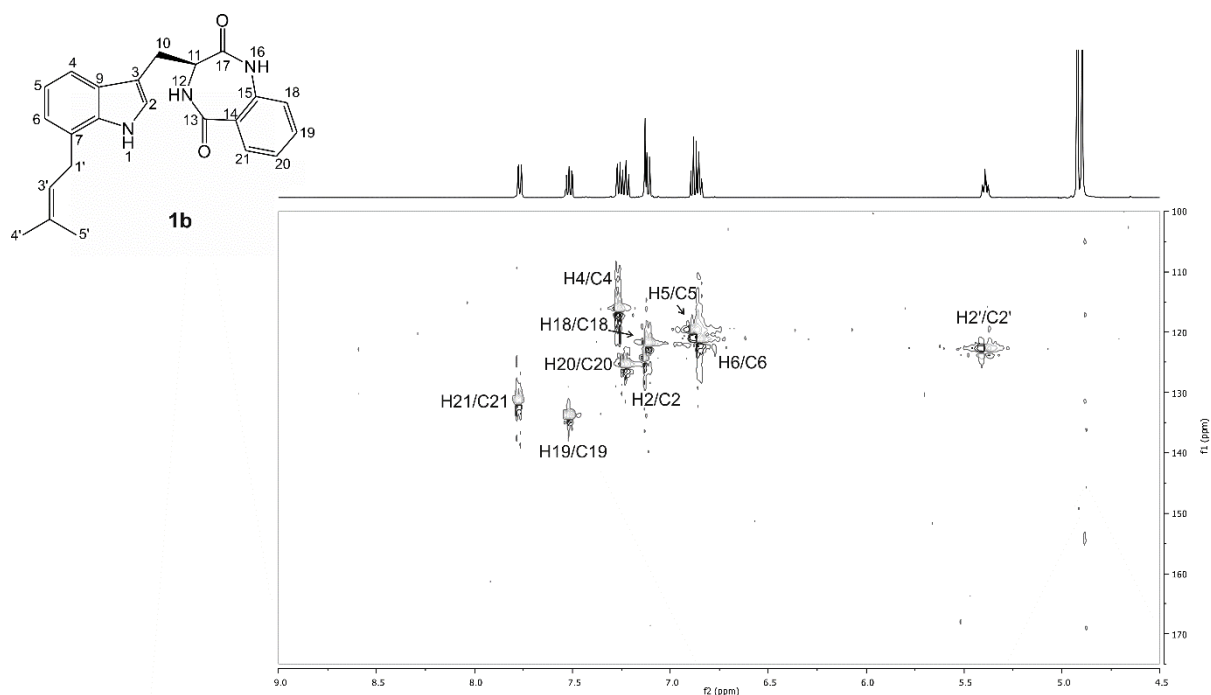


Abb. 7-30: HSQC-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 4,5 - 9,0 ppm;  $\delta_C$ : 100 - 175 ppm).

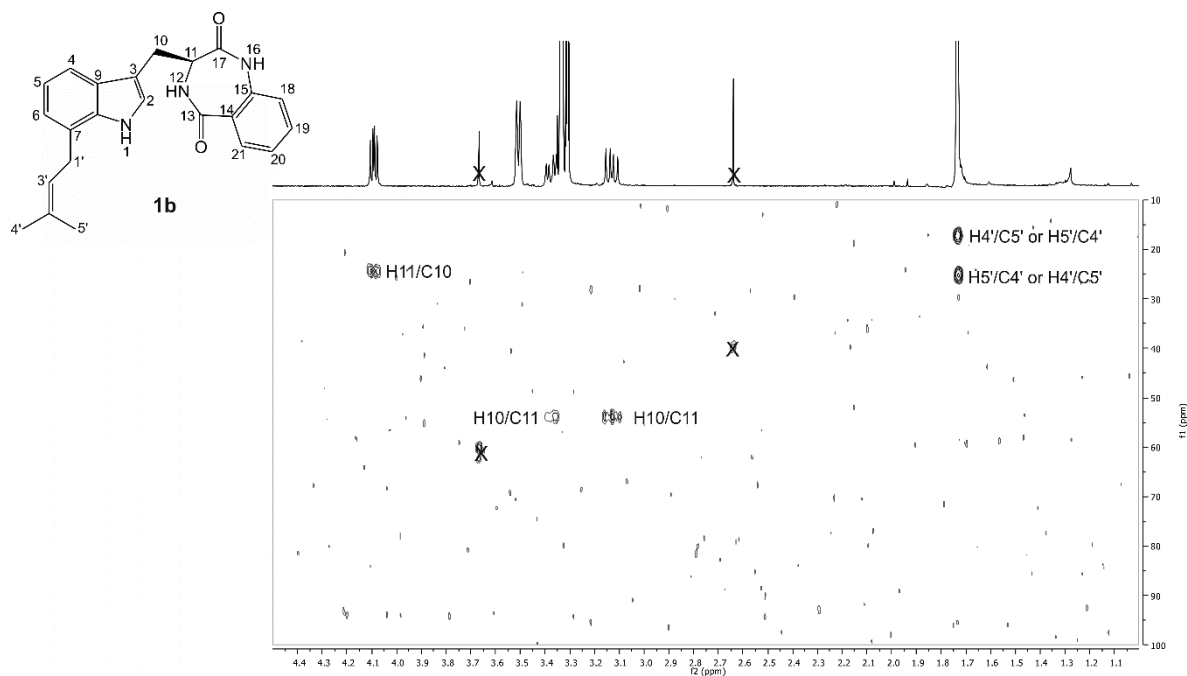


Abb. 7-31: HMBC-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 1,0 - 4,5 ppm;  $\delta_C$ : 10 - 100 ppm).

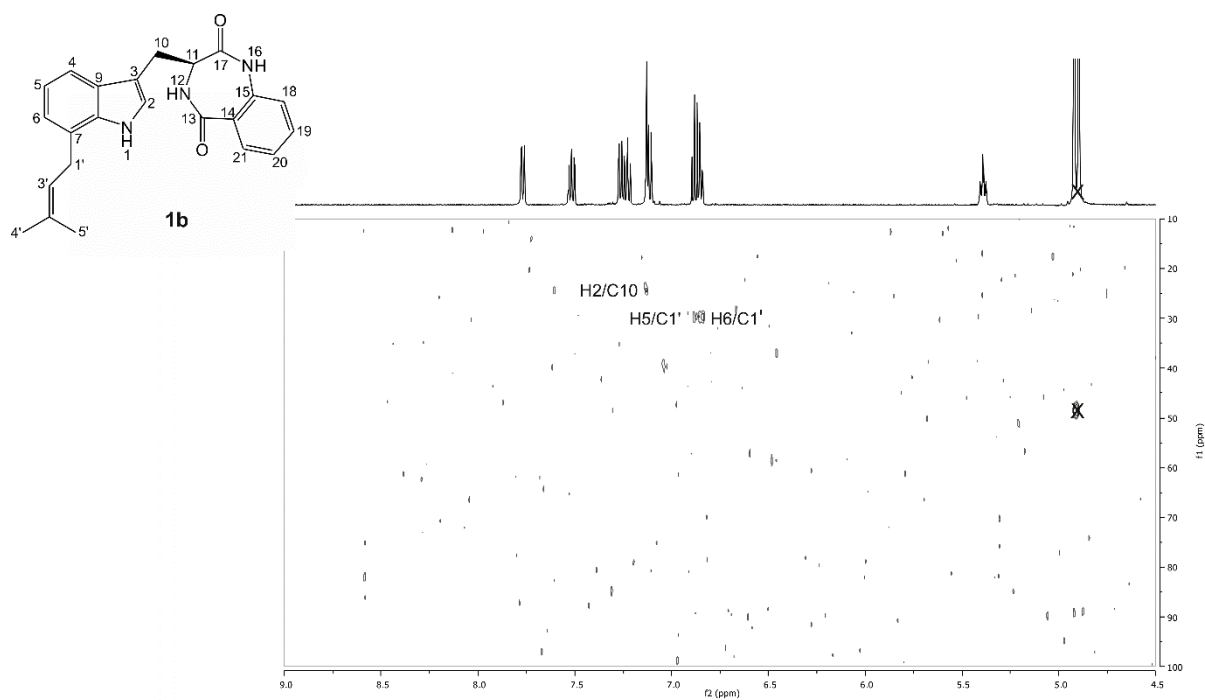


Abb. 7-32: HMBC-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (S)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 4,5 - 9,0 ppm;  $\delta_C$ : 10 - 100 ppm).

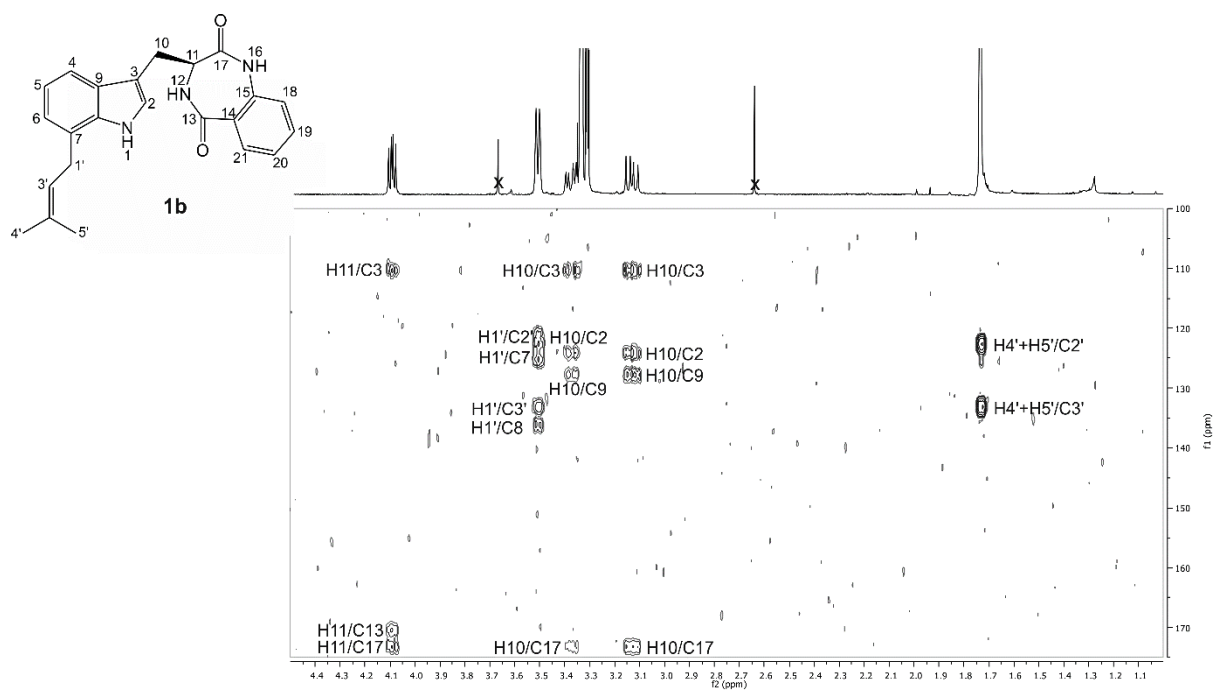
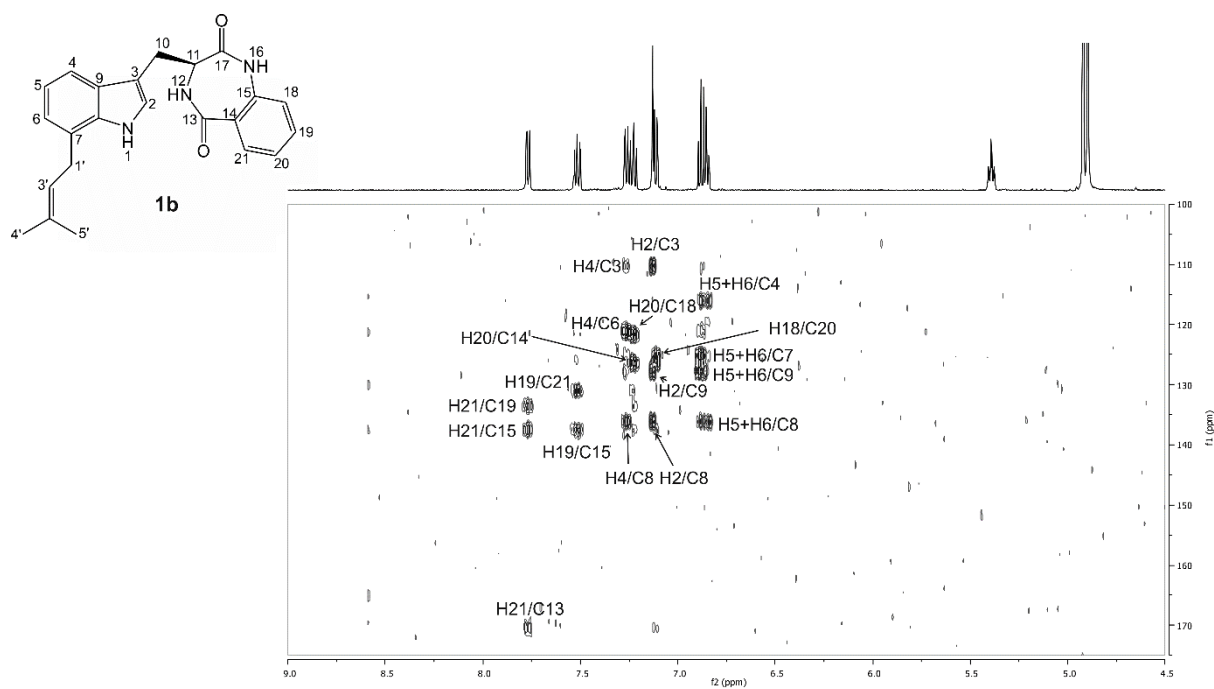
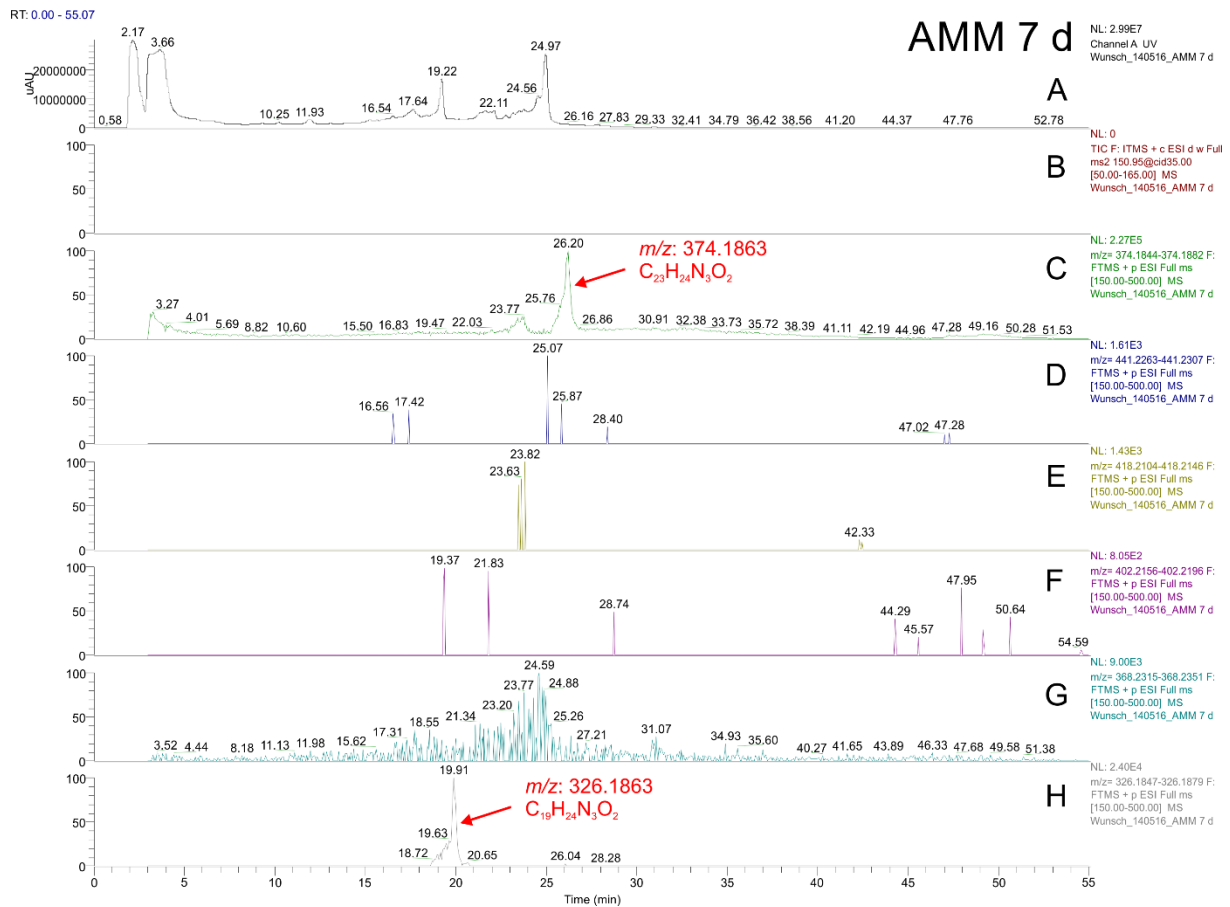


Abb. 7-33: HMBC-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (S)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (1b) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 1,0 - 4,5;  $\delta_C$ : 100 - 175 ppm).

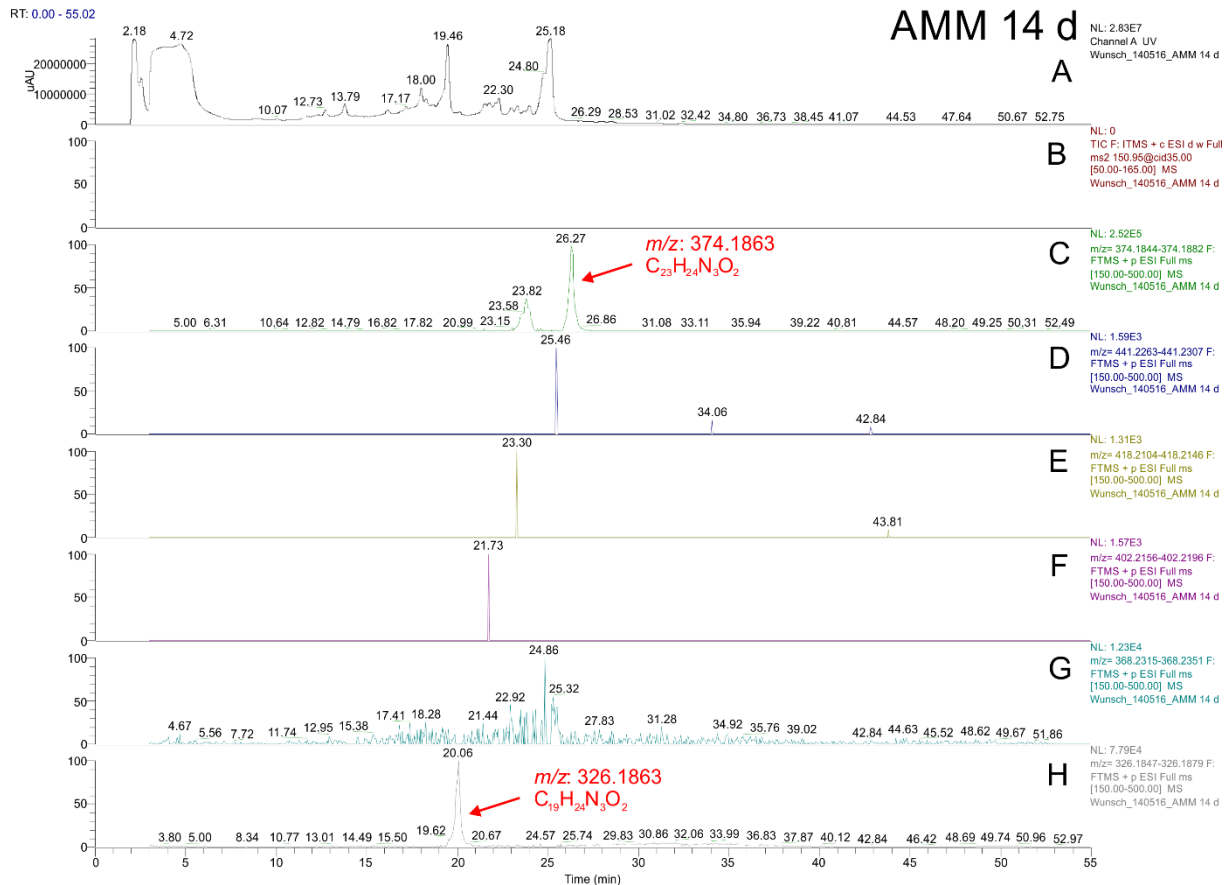


**Abb. 7-34:** HMBC-Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von (*S*)-Benzodiazepindion mit CdpC7PT (**1b**) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz,  $\delta_H$ : 4,5 - 9,0;  $\delta_C$ : 100 – 175 ppm).

### 7.3 LC/MS-Chromatogramme des Pilzes *A. terreus* DSM 1958



**Abb. 7-35: LC/MS Analyse des Kulturfiltrat-Extraktes von *A. terreus* DSM 1958 nach 7 Tagen Kultivierung in AMM Medium.** Der Metabolit mit  $t_R$  von 26,20 min (Chromatogramm C) wurde mit  $m/z = 374,1863$  detektiert, übereinstimmend mit  $[M+H]^+$  Ionen von prenyliertem Benzodiazepindion. Die Retentionszeit dieses Metaboliten stimmt hervorragend mit dem Produkt von AnaPT und (*S*)-Benzodiazepindion überein. Der Metabolit mit  $t_R$  von 19,91 min (Chromatogramm H) wurde mit  $m/z = 326,1863$  detektiert, übereinstimmend mit  $[M+H]^+$  Ionen von prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Ala. Ionen  $[M + H]^+$  für prenyliertes *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit  $m/z = 441,2291$  (Chromatogramm D), prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit  $m/z = 418,2131$  (Chromatogramm E), prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Phe mit  $m/z = 402,2182$  (Chromatogramm F) und prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Leu mit  $m/z = 368,2338$  (Chromatogramm G) wurden nicht detektiert.



**Abb. 7-36: LC/MS Analyse des Kulturfiltrat-Extraktes von *A. terreus* DSM 1958 nach 14 Tagen Kultivierung in AMM Medium.** Der Metabolit mit  $t_R$  von 26,27 min (Chromatogramm C) wurde mit  $m/z = 374,1863$  detektiert, übereinstimmend mit  $[M+H]^+$  Ionen von prenyliertem Benzodiazepindion. Die Retentionszeit dieses Metaboliten stimmt hervorragend mit dem Produkt von AnaPT und (S)-Benzodiazepindion überein. Der Metabolit mit  $t_R$  von 20,06 min (Chromatogramm H) wurde mit  $m/z = 326,1863$  detektiert, übereinstimmend mit  $[M+H]^+$  Ionen von prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Ala. Ionen  $[M + H]^+$  für prenyliertes *cyclo*-L-Trp-L-Trp mit  $m/z = 441,2291$  (Chromatogramm D), prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Tyr mit  $m/z = 418,2131$  (Chromatogramm E), prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Phe mit  $m/z = 402,2182$  (Chromatogramm F) und prenyliertem *cyclo*-L-Trp-L-Leu mit  $m/z = 368,2338$  (Chromatogramm G) wurden nicht detektiert.

## 7.4 NMR- Spektren der isolierten Substanzen aus den EAU34068-Reaktionen

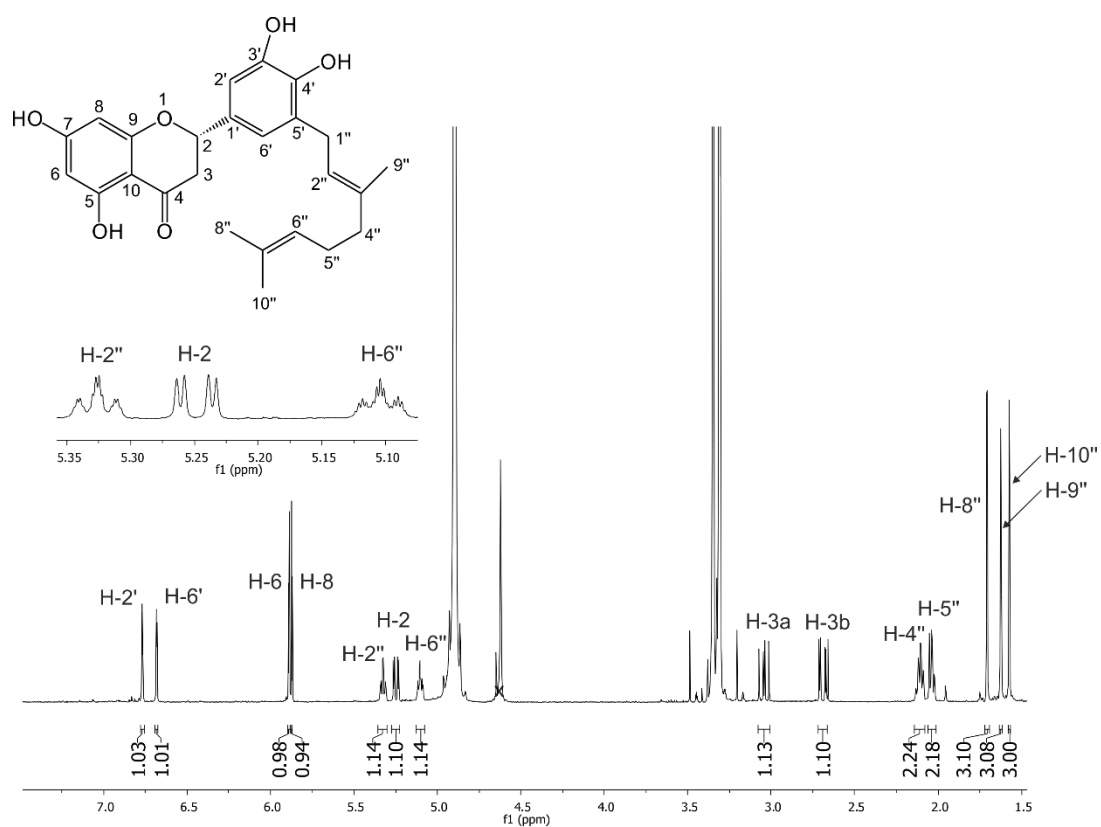


Abb. 7-37:  $^1\text{H}$  NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von Eriodictyol mit EAU34068 (23b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

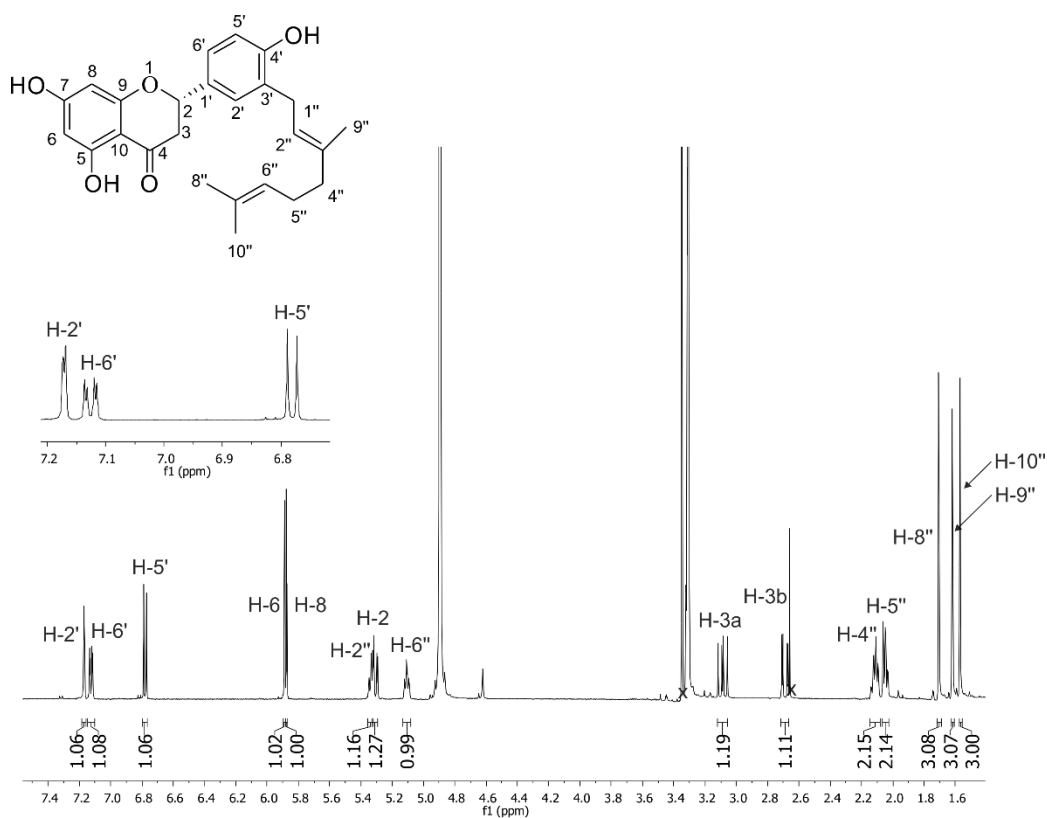


Abb. 7-38:  $^1\text{H}$  NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von Naringenin mit EAU34068 (24b) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

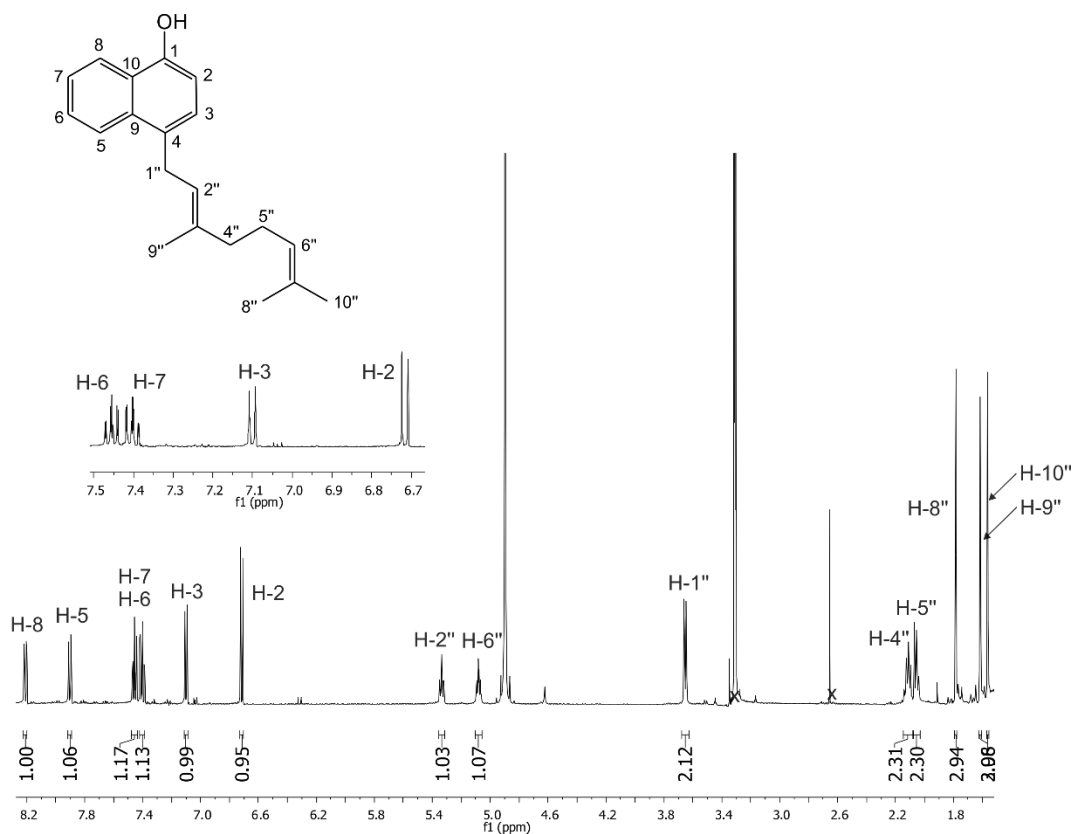


Abb. 7-39: <sup>1</sup>H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von 1-Naphthol mit EAU34068 (25b) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz).

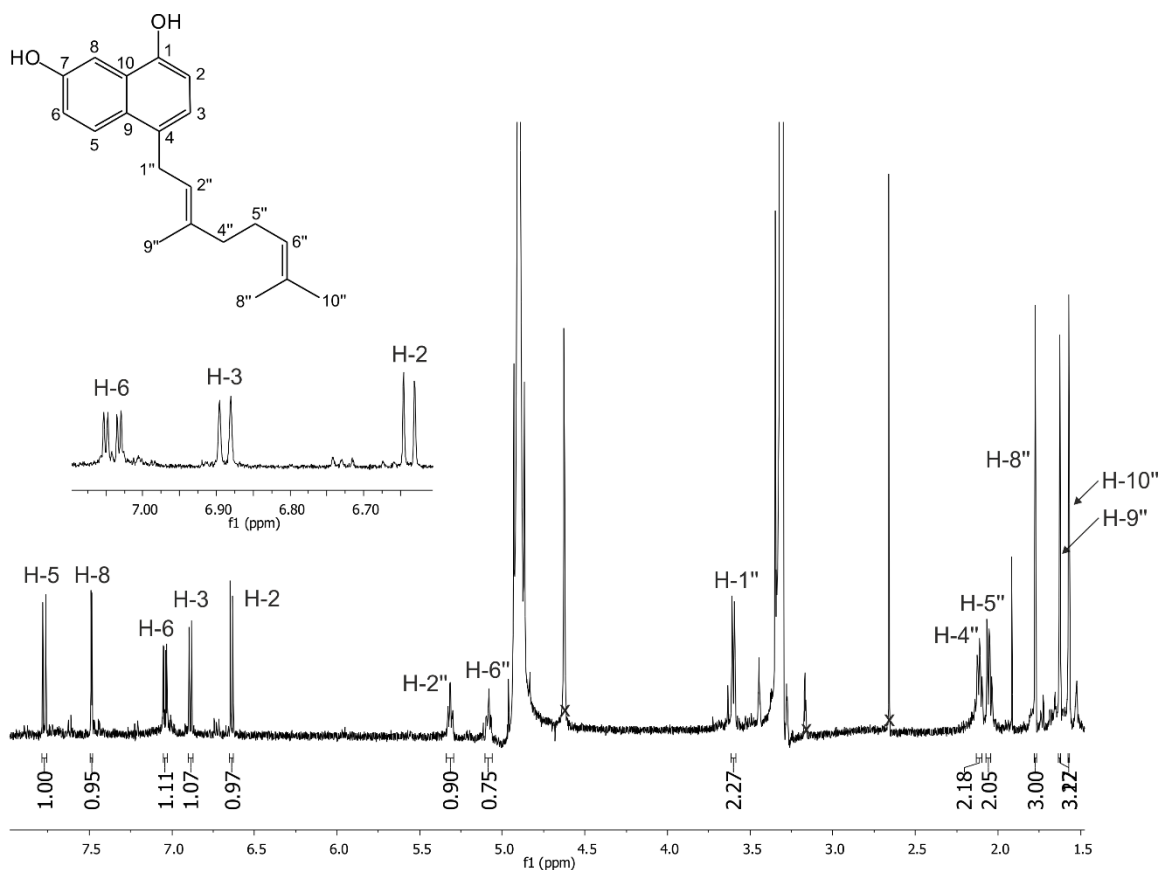


Abb. 7-40: <sup>1</sup>H NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von 1,7-Dihydroxynaphthalin mit EAU34068 (26b) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz).

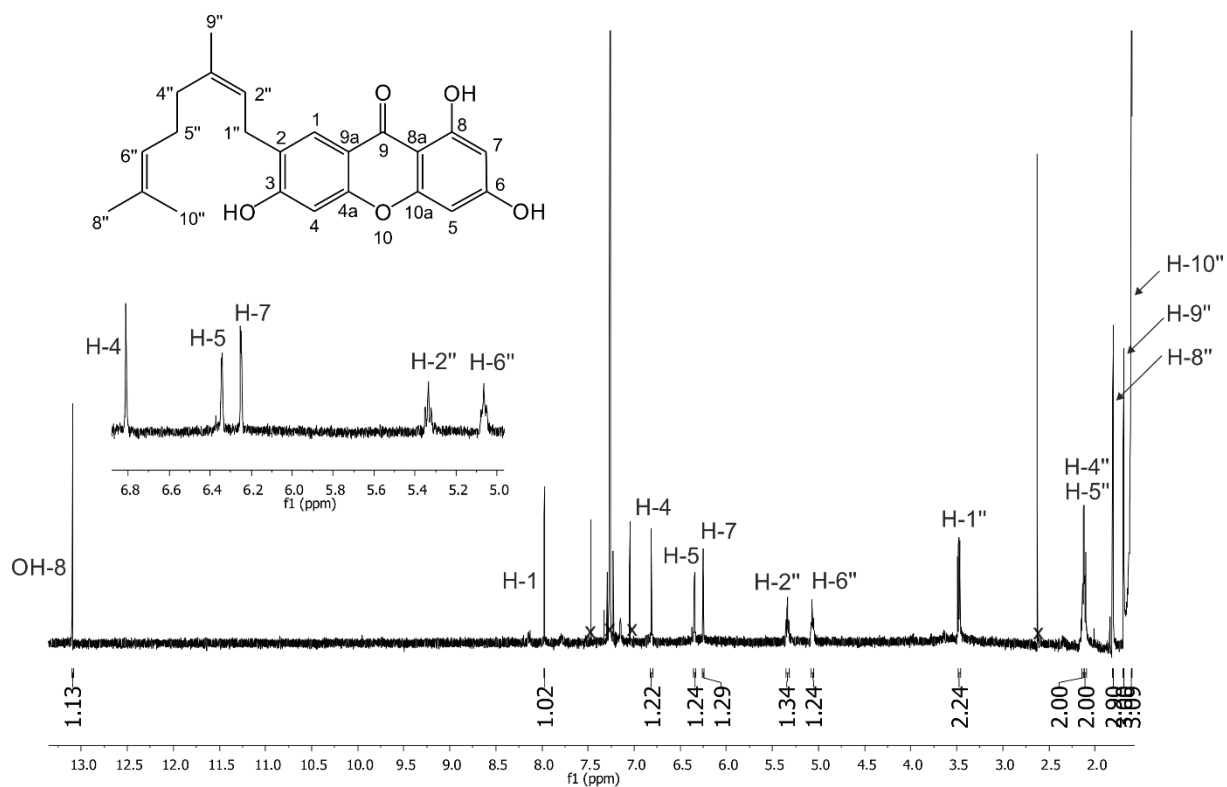


Abb. 7-41:  $^1\text{H}$  NMR Übersichtsspektrum des enzymatischen Produkts von 1,3,6-Trihydroxyxanthon mit EAU34068 (27b) in  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



## 7.5 NMR- und MS- Spektren der isolierten Substanz Sterigmatocystin aus den Transformanten *A. nidulans* CaW11 (AN9226) und CaW32 (NFIA\_043670)

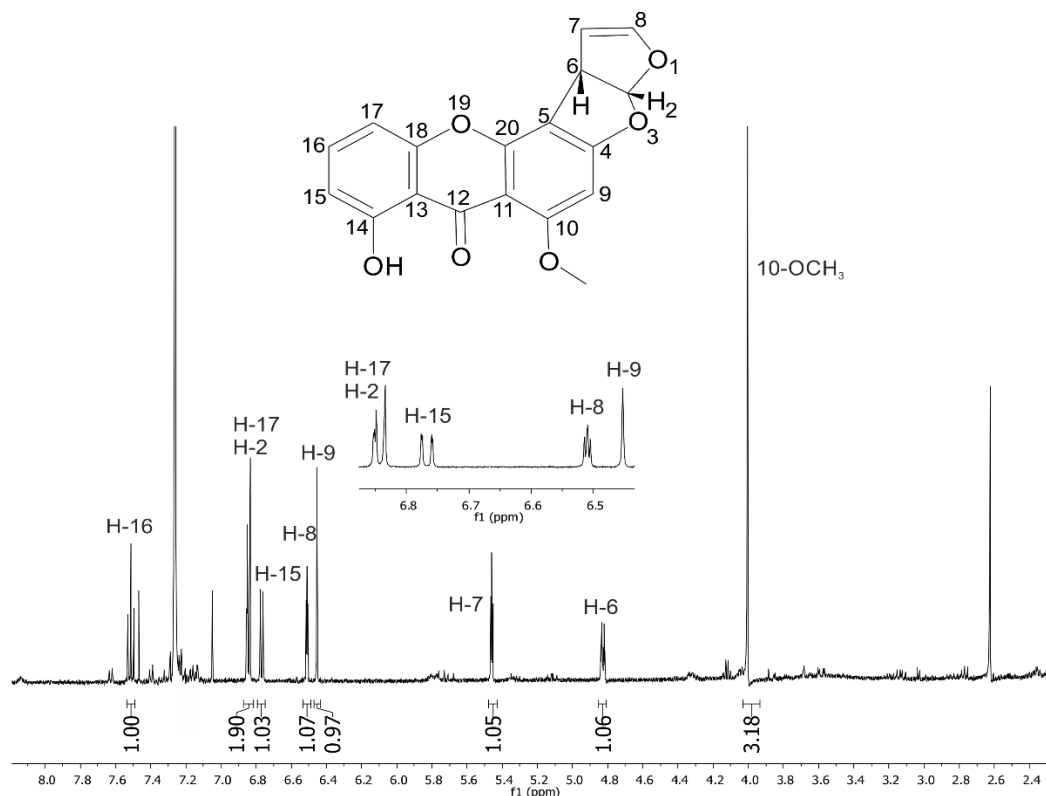


Abb. 7-42: <sup>1</sup>H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes Sterigmatocystin (28a) aus dem Transformanten *A. nidulans* CaW11 (AN9226) in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).

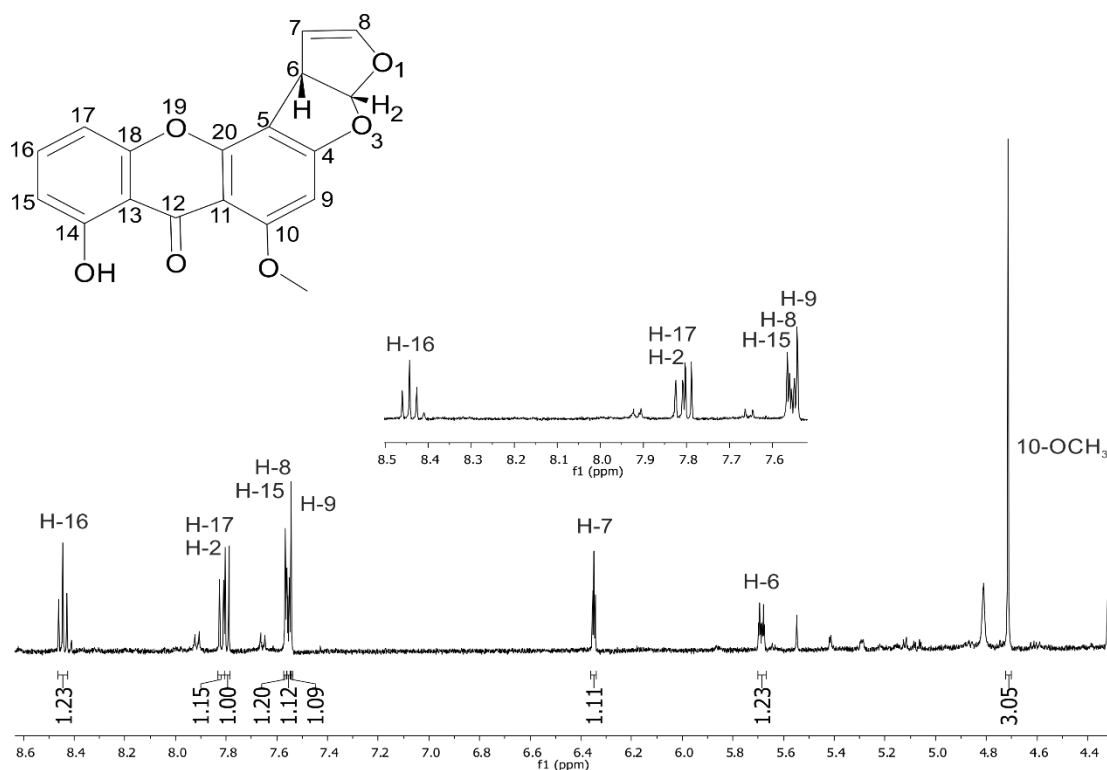
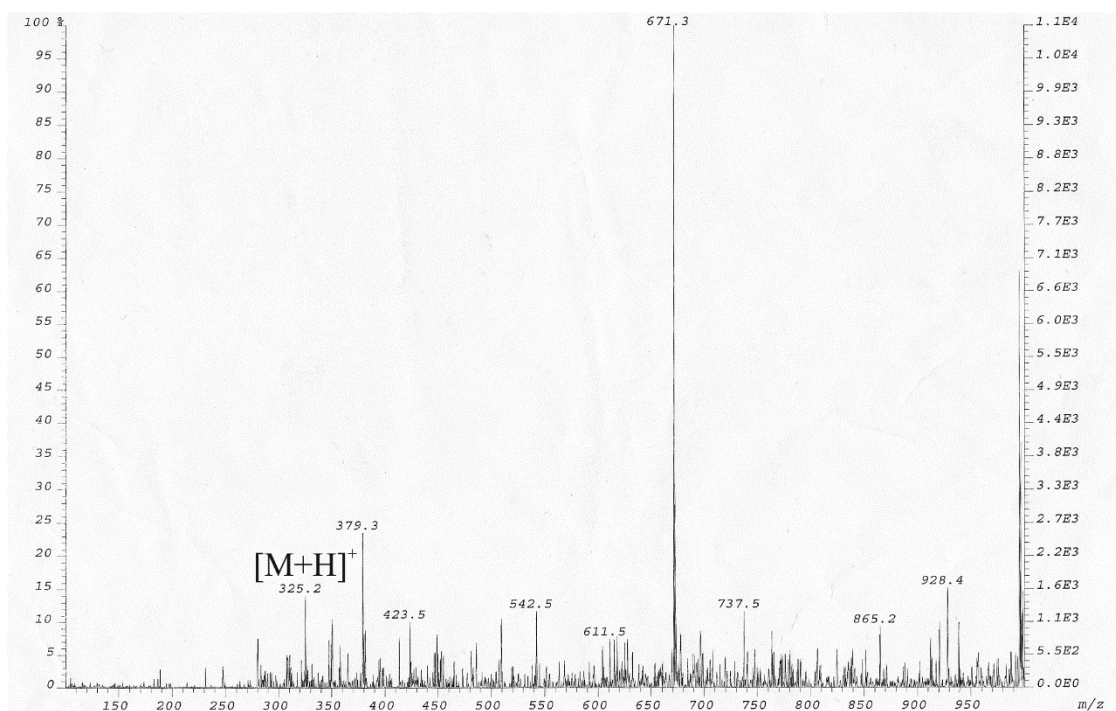


Abb. 7-43: <sup>1</sup>H NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes Sterigmatocystin (28a) aus dem Transformanten *A. nidulans* CaW32 (NFIA\_043670) in CD<sub>3</sub>OD (500 MHz).



**Abb. 7-44:** Positives EI-MS-Spektrum des isolierten Produktes Sterigmatocystin (28a) aus dem Transformanten *A. nidulans* CaW32 (NFIA\_043670), theoretische Masse  $[M+H]^+$ : 325,08.

## 7.6 NMR-, MS- Spektren der isolierten Substanz Brevianamid F aus den Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*)

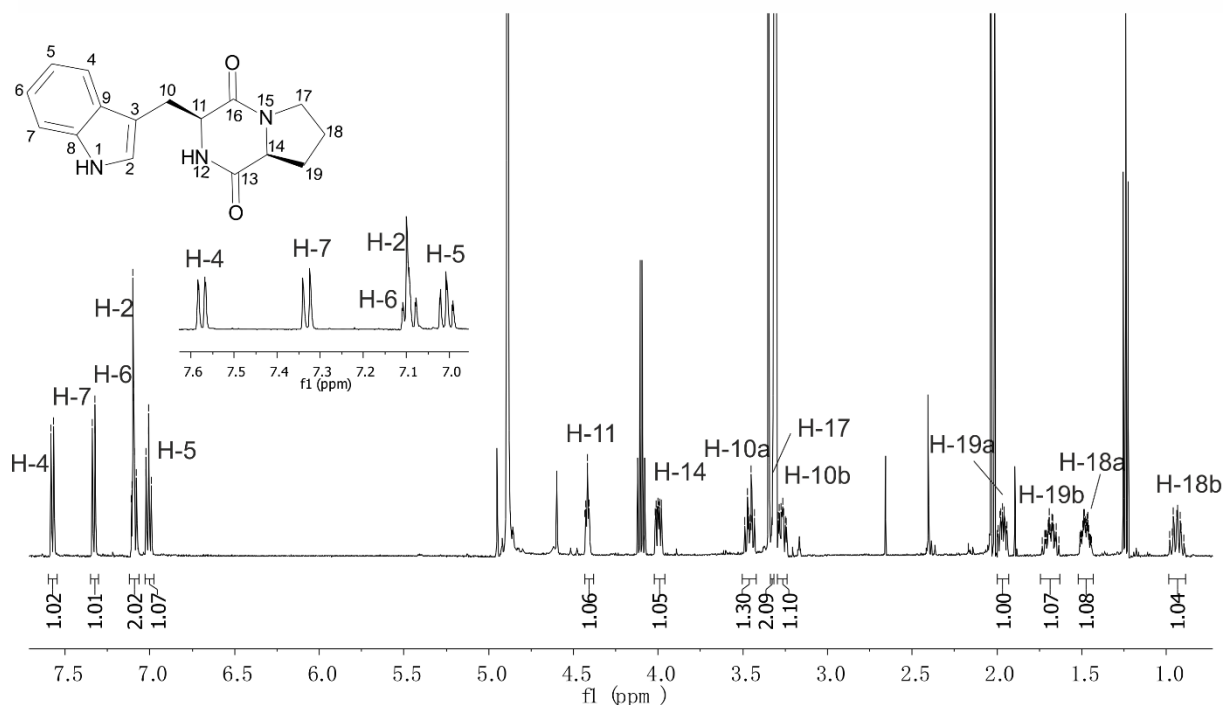


Abb. 7-45:  $^1\text{H}$  NMR Übersichtsspektrum des isolierten Produktes Brevianamid F (11a) aus dem Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500 MHz).

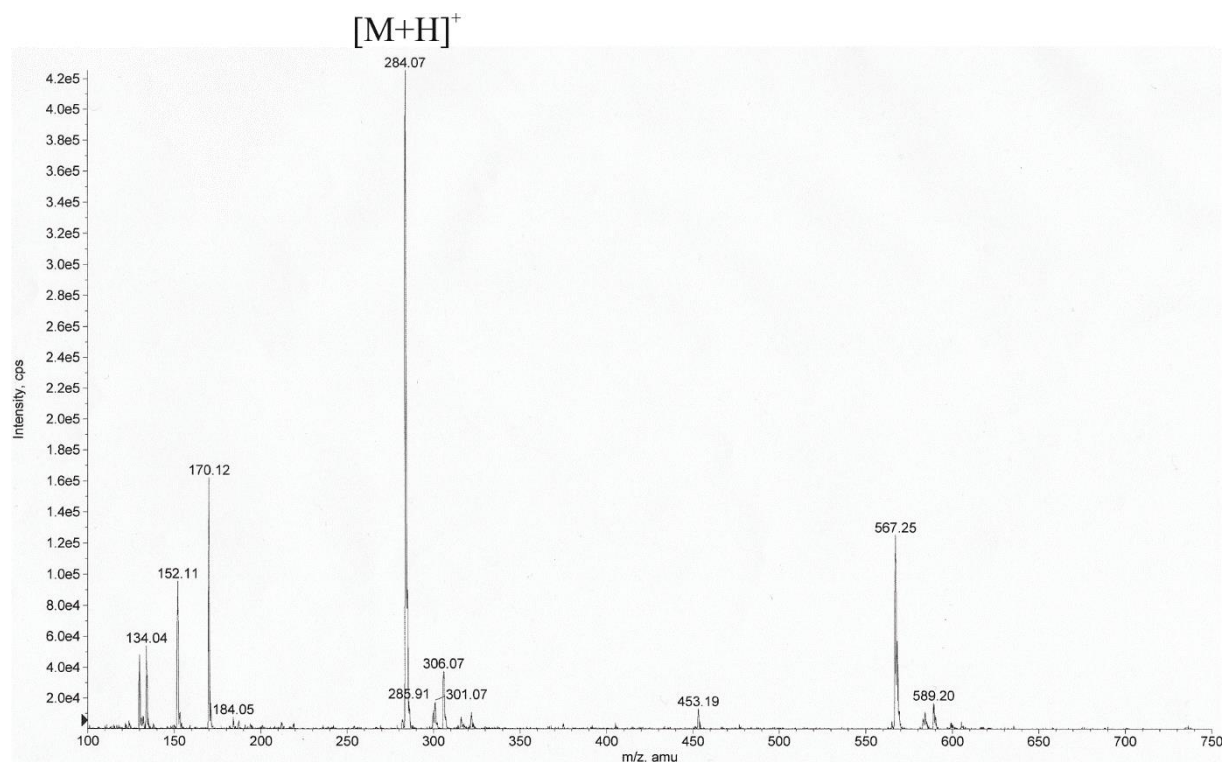


Abb. 7-46: Positives ESI-MS-Spektrum des isolierten Produktes Brevianamid F (11a) aus dem Transformanten *A. nidulans* CaW03 (*ftmPS*), theoretische Masse  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 284,14.

## 7.7 NMR- und MS- Spektren der isolierten Substanz *cyclo*-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro aus dem Transformanten *A. nidulans* KM36 (*cdpNPT*)

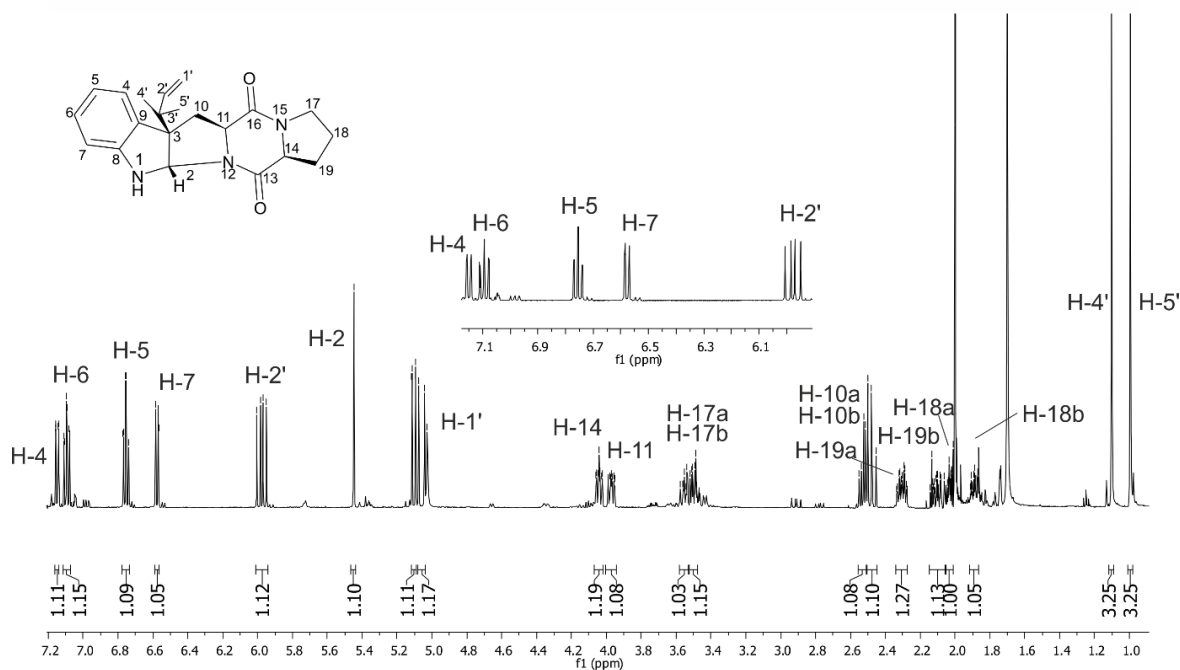


Abb. 7-47: <sup>1</sup>H NMR Übersichtsspektrum isolierten Produktes *cyclo*-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro (11e) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM36 (*cdpNPT*) in CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).

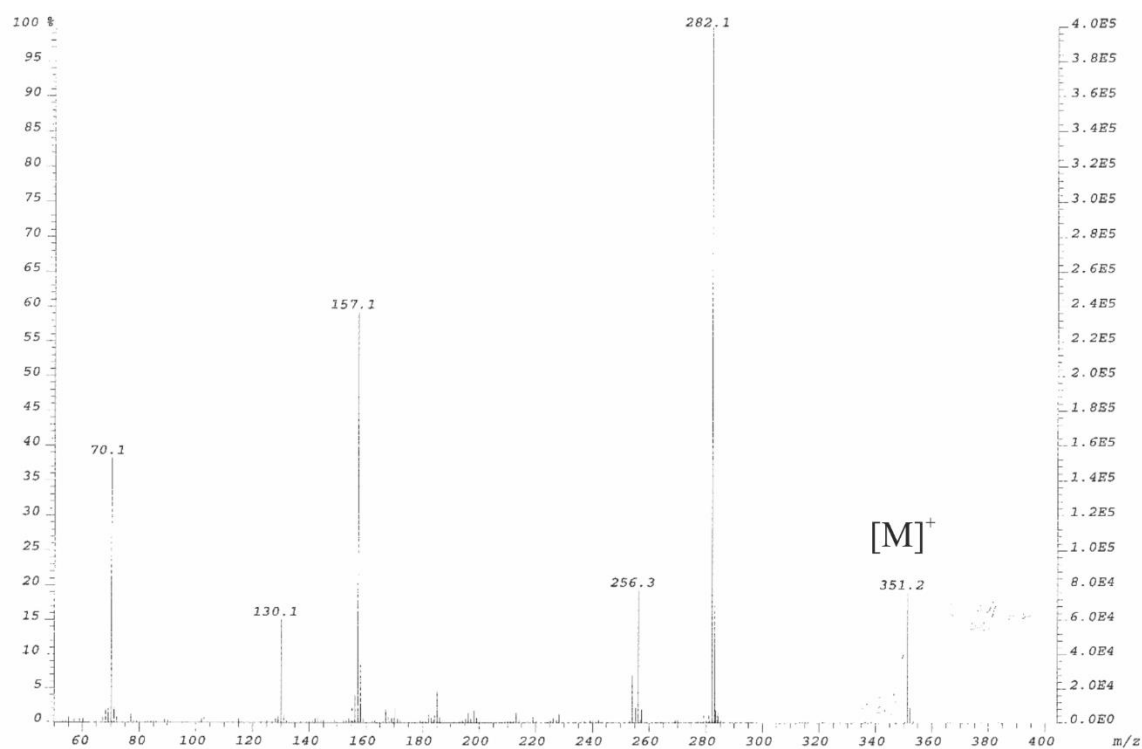


Abb. 7-48: Positives EI-MS-Spektrum des isolierten Produktes *cyclo*-L-3-tert-prenyl-Trp-L-Pro (11e) aus dem Transformanten *A. nidulans* KM36 (*cdpNPT*), theoretische Masse [M+H]<sup>+</sup>: 351,19.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen und stand mir immer mit Rat und Tat zu Seite. Auch danke ich ihm dafür, dass ich 2010 China kennenlernen durfte, dies war für mich eine unglaubliche Erfahrung.

Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Kämpchen und Herr Newel danke ich für die Messung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren und Dr. Laufenberg, Frau Zitzer, sowie Dr. Linne danke ich für die Durchführung und Hilfe im Rahmen der massenspektrometrischen Messungen.

Ein Dank geht natürlich auch an meine aktuellen und ehemaligen Institutskollegen Aili, Alex, Anika, Anne, Beate, Daniel, Edyta, Jennifer, Julia, Katja, Kirsten, Lena, Lennart, Mike, Nici, Nina, Ole, Peter, Soheil, Stefan, Sylwia, Viola, Wen-Bing und Xia.

Chrissy und Marco danke ich für die spannenden Spieleabende mit Knoten-Knut. Ich hoffe wir werden immer in Verbindung bleiben.

Thank you Rui for helping us in Guangzhou during our scientific exchange, I enjoyed our short time very much.

I'd like to thank also Suqin, you're such a good friend of mine. I hope we'll meet again soon.

Meinen Freunden außerhalb des Labors, insbesondere Stefan, Katja und Sebastian möchte ich für ihre Geduld, Unterstützung und aufbauenden Worte bedanken.

Meiner Freundin Kathrin, die immer für mich da ist, ob die Sonne scheint oder es auch einmal regnet. Mein Dank kommt von Herzen für all deine Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit und besonders für deine manchmal erforderliche, unerschöpfliche Geduld mit mir. Vielen Dank auch für alle deine positiven und negativen Anmerkungen zu meiner Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Danke, dass du an meiner Seite stehst und ich mich immer auf dich verlassen kann!

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Brüdern für ihre Unterstützung und Förderung sowie ihre Geduld während der letzten Jahre herzlich bedanken.

## **Curriculum Vitae**

Carsten Wunsch

Persönliche Daten wurden in der elektronischen Fassung entfernt.